

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
Prof. Dr. Dr. André Gessner
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zur Prägung naiver T-Zellen gegen potentielle
HIV-Vakzinekandidaten *in vitro*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janina Käse

2013

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
Prof. Dr. Dr. André Gessner
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchungen zur Prägung naiver T-Zellen gegen potentielle
HIV-Vakzinekandidaten *in vitro*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Janina Käse

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2013

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	8
1. Epidemiologische Daten zur HIV-Pandemie	9
2. Aufbau des HI-Virus und Replikationszyklus	11
2.1. Aufbau des HIV und Überblick über die HIV-Gene	11
2.2. Replikationszyklus	13
3. HIV und das Immunsystem	16
3.1. Überblick über die erworbene Immunität	16
3.1.1. Ablauf der humoralen Immunantwort gegen Viren	17
3.1.2. Ablauf der T-Zell vermittelten Immunabwehr gegen Viren	17
3.2. Ursachen für die Ineffektivität der Immunantwort gegen HIV	19
3.2.1. Ursachen der ineffektiven zellulären Immunreaktion gegen HIV .	19
3.2.2. Ursachen der ineffektiven humoralen Immunreaktion	21
4. Impfstoffkonzepte	22
4.1. Rekombinante Proteinkomponenten zur Induktion breit neutralisieren- der Antikörper	22
4.2. Impfstoffe basierend auf attenuierten und rekombinanten Viren	23
4.2.1. Impfstoffe basierend auf attenuierten Viren	23
4.2.2. Impfstoffe basierend auf rekombinanten Viren	23
4.3. Virus-like particles als mögliche HIV-Vakzine	24
5. Zielsetzung dieser Arbeit	26

II. Material und Methoden	27
6. Methoden	28
6.1. Herstellung von HIV-VLPs	28
6.1.1. Das Bac-to-Bac Expressionssystem	28
6.1.2. Herstellung des rekombinanten Bacmids	30
6.1.3. Herstellung des rekombinanten Baculovirus	37
6.2. Untersuchung der Aufnahme von VLPs durch DCs	44
6.2.1. Untersuchung der Präsentation von mammalian VLPs durch DCs	44
6.2.2. Untersuchung der Präsentation von baculoviralen VLPs durch DCs	50
6.2.3. Untersuchung der Aufnahme von GFP-VLPs durch DCs	51
6.3. "In vitro Priming" von naiven T-Zellen durch maturierte, gepulste DCs . .	54
6.3.1. Generierung von DCs	54
6.3.2. Generierung von humanen CD4 ⁺ T-Zellen mittels Dichtestufen- gradientenzentrifugation und Magnetic Cell Sorting	54
6.3.3. Kokultur von T-Zellen und DCs	55
6.3.4. Intra- und extrazelluläre Färbung von T-Zellen und Analyse mit- tels Durchflusszytometrie	56
III. Ergebnisse	57
7. Ergebnisse	58
7.1. Herstellung von VLPs mit dem Bac-to-Bac System von Invitrogen	58
7.2. Experiment zur Aufnahme von M-VLPs in DCs	63
7.3. Experiment zur Aufnahme von CFDA markierten BV-VLPs und M-VLPs in DCs	71
7.4. Experiment zur Produktion von GFP-Gag VLPs und Untersuchung der Aufnahme in DCs	75

7.5. Experiment zur Prägung von naiven T-Zellen mit VLPs "in vitro"	82
7.5.1. Optimierung der Kulturhaltung und Maturation von DCs in FKS freiem Medium	82
7.5.2. Versuche zur Maturation von DCs	89
7.5.3. Prägung naiver T-Zellen	92
7.5.4. Statistische Auswertung	101
 IV. Diskussion	 111
7.6. Aufnahme von CFDA markierten VLPs in DC	114
7.7. GFP-VLP Projekt	116
7.8. Experiment zur Prägung naiver T-Zellen gegen HIV-Antigene	118
7.8.1. Versuche zur Kulturhaltung von humanen DCs	118
7.8.2. Versuche zur Prägung von naiven humanen T-Zellen	121
7.9. Zusammenfassung	124
 Literaturverzeichnis	 125
 Anhang	 137
 A. Anhang	 138
A.1. Codonoptimierte Sequenzen für das GFP-gag-Gen	138
A.2. Verwendete Klonierungsvektoren	142
A.3. Genetische Eigenschaften verwendeter Bakterien	143
A.4. Spenderliste	143
 B. Abkürzungen	 144
 C. Danksagung	 148

Teil I.

Einleitung

1. Epidemiologische Daten zur HIV-Pandemie

Die ersten Fälle von AIDS (kurz AIDS für Acquired immune deficiency syndrome) wurden im Jahr 1981 von Durack DT. im "New England Journal of Medicine" beschrieben [26]. Bei den Patienten handelte es sich um zuvor gesunde, junge, homosexuelle Männer, die ambulant opportunistische Infektionen erwarben, die bisher vor allem als Komplikation im Kontext der medikamentösen Immunsuppression, zum Beispiel nach Organtransplantation, bekannt waren. Bereits zwei Jahre später konnten Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi mit der Isolation des Humanen-Immundefizienz-Virus (kurz: HIV) die Ursache der Immunschwächekrankheit aufklären [8, 77]. Heute, mehr als 30 Jahre nach dem Bekanntwerden der ersten Krankheitsfälle, sind laut der UNAIDS weltweit bereits mehr als 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Die am Weltaids-Tag 2012 durch die UNAIDS veröffentlichten Zahlen zur weltweiten Pandemie zeigten einen erfreulichen Rückgang der Neuinfektionen um 20% im Vergleich zu Daten aus dem Jahr 2001. Die Hälfte der verhinderten Neuinfektionen kann dabei auf ein besseres Management der parenteralen Infektionen zurückgeführt werden. Auch die mit AIDS assoziierten Todesfälle konnten Dank des verbesserten Zuganges zu antiretroviraler Therapie weltweit innerhalb von 6 Jahren um 24% gesenkt werden. Dennoch starben auch 2011 weltweit 1,7 Millionen Menschen an AIDS. 2,5 Millionen Menschen wurden 2011 neu infiziert. Dabei zeigte sich ein Anstieg der Zahl an Neuinfektionen vor allem im mittleren Osten, Nordafrika aber auch in Zentralasien und Osteuropa. Zwar konnte durch die Entwicklung von Medikamenten gegen HIV die Lebenserwartung infizierter Personen erhöht werden, jedoch sind die Medikamente nicht allen Patienten zugänglich und eine weitere Ausbreitung der Pandemie kann durch sie nicht sicher verhindert werden. Noch immer leben 7 Millionen Menschen mit der Infektion ohne Zugriff auf eine effektive Therapie. Die Kosten für Be-

handlung und Prävention von AIDS werden sich im Jahr 2015 schätzungsweise auf 24 Milliarden US-Dollar belaufen [57]. Obwohl diesen Maßnahmen große Bedeutung zukommt, wäre die Entwicklung eines sicheren und effektiven HIV-Impfstoffes die beste Möglichkeit, die weltweite AIDS-Pandemie zu kontrollieren. Dabei sollte eine Vakzine entweder vor einer Infektion schützen, oder die Viruslast nach erfolgter Infektion senken und damit den Ausbruch von AIDS verhindern [46, 6].

2. Aufbau des HI-Virus und Replikationszyklus

2.1. Aufbau des HIV und Überblick über die HIV-Gene

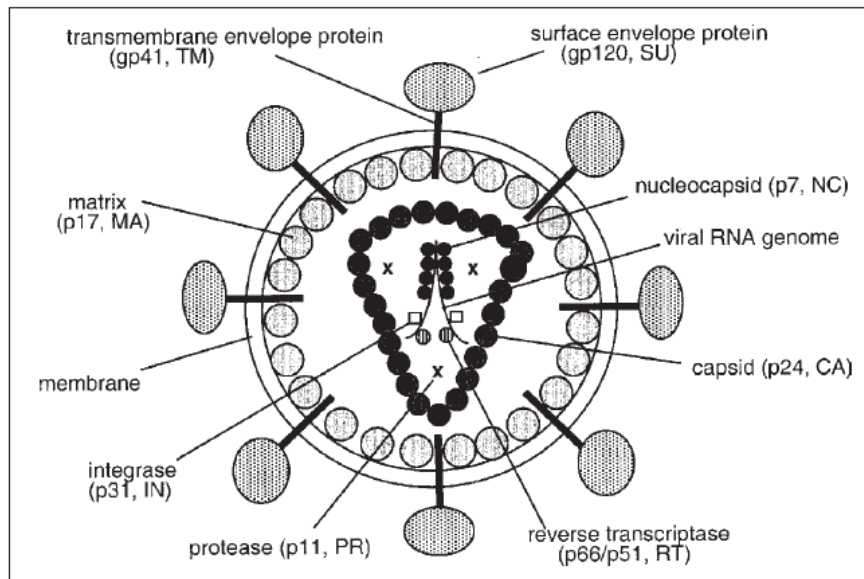


Abbildung 2.1.: Viruspartikel (Reproduziert aus Ref. [32]): Schematische Darstellung eines matten HIV-1 Virions. Im Inneren liegen zwei Kopien des RNA-Genoms, die mit dem Nucleocapsidprotein p7 komplexiert sind. Die RNA ist vom konischen Capsid ummantelt, das sich aus dem Capsidprotein p24 zusammensetzt. Das Capsid wird von einer Hüllmembran umgeben, die das extern liegende gp120 Env und das transmembranär liegende gp41 Env enthält. An der Innenseite der Membran ist das Matrixprotein p17 assoziiert.

HIV-1 und HIV-2 sind "Reverse Transkriptase Onko Viren", auch kurz "Retroviren" genannt und gehören zur Familie der Lentiviren. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass ihr Genom in Form einer Einzelstrang RNA vorliegt, die nach Infektion der Zelle durch das Enzym "Reverse Transkriptase" (kurz: RT) in Doppelstrang DNA konvertiert wird. Im Rahmen physiologischer Vorgänge innerhalb eukaryotischer Zellen, wird hingegen stets RNA aus DNA transkribiert. Die genetische Homologie von HIV-1 und HIV-

2 beträgt nur etwa 50%. HIV-1 ist virulenter, infektiöser und für den größten Teil der weltweiten Infektionen verantwortlich. Infektionen mit HVI-2 kommen vor allem in West Afrika vor [37, 72]. Da HIV-2 lediglich etwa 1% der weltweiten Infektionen ausmacht, wird im Folgenden auf die Struktur von HIV-1 eingegangen.

Der HIV-1-Viruspartikel ist 100 nm groß. Der Aufbau ist in Abb.2.1 dargestellt. Im Kern liegen zwei Kopien der HIV-RNA, die an das Protein p7 und das Enzym Reverse Transkriptase (inklusive seiner Integrasefunktion) p66 gebunden sind. Umgeben wird die RNA vom zylindrisch angeordneten p24-Kapsid-Antigen. Zwischen Kapsid und Virushülle liegt das Matrixprotein p17, das an der Innenseite der Lipidhülle verankert ist. In die Lipoproteinhülle integriert liegen die Env-Glykoproteinkomplexe. Diese bestehen aus zwei Anteilen: dem extern liegenden gp120 und dem transmembranär gebundenen gp41, die nicht kovalent miteinander verbunden sind [84].

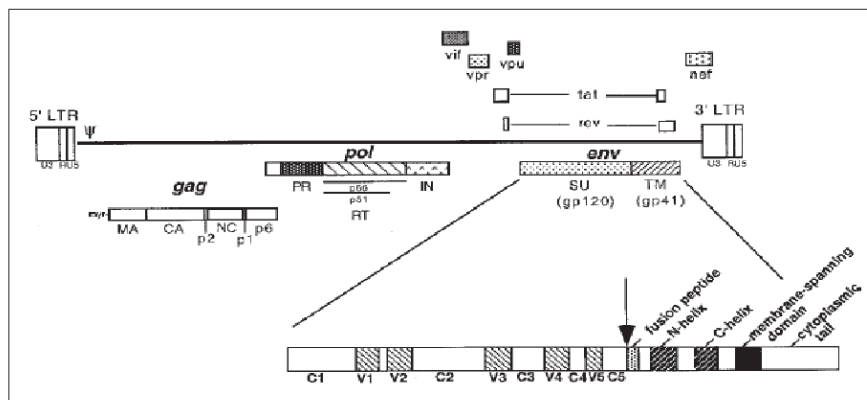


Abbildung 2.2.: Organisation des HIV-1 Genoms (Reproduziert aus Ref. [32]). Gezeigt sind die relativen Positionen der offenen Leseraster für gag, pol, env, vif, vpr, vpu, nef, tat und rev auf der HIV-1-DNA. Die Haupt-Gag-Domänen (MA, CA, NC, p6) und die Gag-Platzhalterpeptide (p2 und p1) sind unter dem gag-Gen abgebildet. Das myristylierte N-terminale Ende von Gag ist mit "myr" bezeichnet. Unter dem pol-Gen sind die PR, RT und IN kodierenden Regionen abgebildet. Die SU und TM Env-Glykoproteine sind vergrößert dargestellt, um die konservativen Regionen (C1-C5), die variablen Regionen (V1-V5) im gp120, die Lokalisation der Fusionspeptide, die N- und C-helices, die transmembranäre Domäne und das zytoplasmatische Ende von gp41 genauer abzubilden.

Das Genom von Retroviren ist wie in Abb. 2.2 aufgebaut. Es enthält die Sequenzen '5 LTR-gag-pol-env-LTR 3'. Die Gene "env", "gag" und "pol" kodieren für die Strukturproteine des Virus. Das gag-Gen kodiert die Strukturproteine p24, p17, p7 und p6. Env kodiert für die beiden Glykoproteine gp120 und gp41. Pol kodiert für die Enzyme des muren HIV-Partikels: Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Neben diesen Genen enthält die HIV-DNA noch sechs weitere Gene: Virion infectivity factor (Vif), Viral Protein Unique (Vpu), Viral Protein R (Vpr), Trans-Activator of Transcription (Tat), Regulator of Virion Expression (Rev) und Negative Regulatory Factor (Nef). Tat und Rev wirken regulatorisch und binden an die virale RNA. Sie stimulieren die Transkription und Elongation der RNA. Nef führt zu einer Herabregulation des CD4 Oberflächenrezeptors, was den Angriff zytotoxischer T-Zellen gegen infizierte Zellen erschwert [17]. Vpu spielt für das Ausknospen des Viruspartikels aus der Wirtszelle eine entscheidende Rolle. Vif interagiert mit APOBEC3G. APOBEC3G ist eine intrazelluläre Cytidin-Deaminase, die durch Deaminierung von Cytidin in mRNA und viraler Einzelstrang-DNA zur Hypermuation und damit zu deren Degeneration und Abbau führt. Vif bildet Komplexe mit APOBEC3G wodurch dessen Funktionalität verloren geht [65]. Vpr stimuliert die "HIV-Long terminal Repeats" (auch kurz LTRs) und diverse zelluläre Transporter und ist für die Virusreplikation in nicht-teilenden Zellen wie Makrophagen wichtig. Dabei ist es auch im Präintegrationskomplex enthalten und bewirkt dessen Transport in den Zellkern [69]. Der Präintegrationskomplex entsteht nach Abschluss der DNA-Synthese und beinhaltet neben der viralen DNA auch die viralen Proteine Integrase, p17 und Reverse Transkriptase [58].

2.2. Replikationszyklus

Im ersten Schritt des Replikationszyklus bindet das Virus mit dem Glykoprotein gp120 an den CD4 Rezeptor [62]. Dieser Rezeptor findet sich auf T-Lymphozyten und T-Vorläuferzellen, sowie auf Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen, dendritischen Zellen (auch kurz DC) und Mikrogliazellen. Neben dem CD4 Rezeptor benötigt das

Virus für die Membranfusion verschiedene Chemokinrezeptoren als Korezeptoren. Dabei werden sogenannte "M-trope" und "T-trope" Virusstämme unterschieden. T-zelltrope Virusstämme benötigen den CXCR4-Korezeptor für eine Membranfusion und infizieren vorwiegend aktivierte periphere mononukleäre Blutzellen (Englisch: Peripheral blood mononuclear cells, kurz: PBMC) und Zellreihen. Monozytotrope Viren nutzen den CCR5-Rezeptor und infizieren sowohl PBMCs als auch Monozyten und Makrophagen.

Die Interaktion mit dem Korezeptor erfolgt durch eine Konformationsänderung nach der Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor [82]. Nach der Membranfusion folgt das sogenannte "Uncoating". Dabei entleert sich der Viruskern in die Zielzelle. Im Zytoplasma erfolgt mittels des Enzyms RT die Transkription der Einzelstrang-RNA zur Doppelstrang-DNA. Zunächst wird dazu ein RNA-DNA Hybrid gebildet. Anschließend wird die RNA mit Hilfe der RNase Eigenschaft der RT abgebaut. Anschließend erfolgt die Ergänzung der Einzelstrang- zur Doppelstrang DNA mittels der DNA-abhängigen DNA-Polymerase-Eigenschaft der RT.

Dieser Kontakt führt zur Membranfusion.

Der Prozess der reversen Transkription ist extrem fehlerbehaftet, da die DNA Polymerase nicht über eine Korrekturfunktion verfügt. Während die Polymerase I der eukaryotischen Zellen Fehler in der DNA-Basensequenz korrigiert, besteht eine solche Funktion für das Enzym RT nicht. "In vitro" Experimente zeigten Fehlerraten von durchschnittlich 1:1700 Basenpaaren [70]. Daraus resultiert die große genetische Flexibilität des Virus. Diese führt zur Bildung von Resistenzen gegen Medikamente und erschwert eine Abwehr durch das Immunsystem [2]. Nach dem Transport in den Nukleolus wird die entstandene DNA mittels der viralen Integrase in das Wirtsgenom eingebaut und ruht bis zu Aktivierung der Zielzelle als Provirus im Genom [47]. Die Transkription der viralen DNA erfolgt durch zelluläre Transkriptionsfaktoren, die an die Long-Terminal-Repeat-Region des Provirus binden [41].

Im ersten Schritt entstehen aus mehrfach gespleißter mRNA die frühen, regulatorischen HIV-Proteine wie Tat und Rev. Tat bindet an die Tar-Region der DNA und

unterstützt die Bildung langer, ungespleißter RNA Stücke [62]. Diese werden mit Hilfe von Rev aus dem Kern ausgeschleust. Die beiden regulatorischen Proteine ermöglichen so die Bildung von Strukturproteinen für den matten Viruspartikel [68]. Zu den Strukturproteinen gehören unter anderem das Gag Vorläufermolekül Pr55^{gag} und die Env-Genprodukte. Die Env-Genprodukte werden durch die Protease in die Glykoproteine gp120 und gp41 gespalten und wandern zur Zelloberfläche wo sie für die Synthese des Viruspartikels benötigt werden. Eine Leserasterverschiebung führt zur Bildung kleiner Mengen des Gag/Pol-Vorläuferproteins, das zusammen mit Pr55^{gag} ebenfalls an der Zelloberfläche aggregiert [82, 87]. Das spätere Matrixprotein sitzt am N-terminalen Ende des Gag-Vorläufers und bindet direkt mit seiner myristylierten Domäne an die Zellmembran [80]. Die Gag Proteine knospen von der Zelloberfläche ab, wobei die Env-Glykoproteinkomplexe in das Virion integriert werden. Der so entstandene unreife Viruspartikel beinhaltet zudem zwei Kopien des viralen Genoms. Im Rahmen der Reifung des Viruspartikel werden die Gag und Gag/Pol-Vorläuferproteine von der Protease in die Proteine p24, p17, p9, p7 und p6 gespalten. Es kommt zur Kernkondensation und zur Entstehung infektiöser Viren.

3. HIV und das Immunsystem

3.1. Überblick über die erworbene Immunität

Für die Abwehr einer viralen Infektion bedarf es einer adaptiven Immunantwort, die auch iatrogen durch die Applikation eines Impfstoffes induziert werden kann. Die Wirksamkeit einer Vakzine ist dabei durch die Möglichkeiten determiniert, die dem Immunsystem bei der Abwehr eines Pathogens zur Verfügung stehen. Um die Probleme bei der Entwicklung einer Vakzine gegen HIV deutlich zu machen, sollen in den Kapiteln 3.1.1. und 3.1.2. zunächst die Grundzüge der adaptiven Immunität erläutert werden. Einen Überblick über die geschilderten Abläufe gibt Abbildung 3.1.

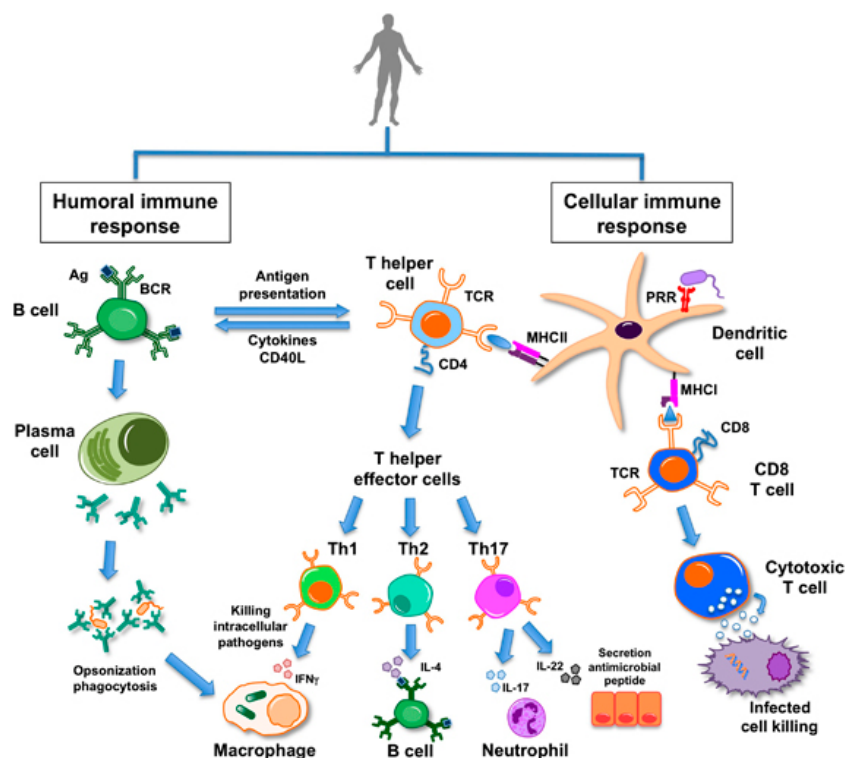


Abbildung 3.1.: Die Abbildung gibt einen Überblick über die erworbene Immunität. Dargestellt sind die verschiedenen Zellen, die für eine adaptive Immunantwort nötig sind und ihre gegenseitige Wechselwirkung. (Reproduziert aus Ref. [59])

3.1.1. Ablauf der humoralen Immunantwort gegen Viren

Die humorale Immunabwehr wird von den B-Lymphozyten vermittelt. Die Effektorzellen sind die Plasmazellen. Sie entstehen aus Antigen-stimulierten naiven B-Lymphozyten. Im Fall von Viren bedarf es für die Differenzierung zur Plasmazelle dem Kontakt zu einer T-Helferzelle.

Naive B-Zellen nehmen das virale Antigen in der Peripherie auf, und präsentieren es aktivierten T-Zellen. Es kommt zu einer beiderseitigen Stimulation, an deren Ende die Proliferation der B-Zelle steht. Diese findet in den Follikeln der lymphatischen Organe statt. Durch den Kontakt mit der T-Helferzelle wird die Mutation jener B-Zell-DNA-Sequenzen angeregt, die für die variable Region der Antikörper (kurz AK) kodieren. Dadurch verändert sich deren Passform für das Zielantigen innerhalb des AK. Im Rahmen der Reifung der B-Zellen in den Lymphfollikeln kommt es zu einer positiven Selektion solcher B-Zellen, deren AK besonders effektiv an das virale Antigen binden kann. Diese Selektion wird durch follikuläre DCs vermittelt und führt zur Entstehung antigenspezifische B-Effektorzellen und B-Gedächtniszellen. Die von ihnen produzierten AK sind in der Lage, Neuinfektionen von Zellen durch Viren zu verhindern, indem sie diese vor dem Eindringen in die potentielle Wirtszelle binden und damit unschädlich machen.

3.1.2. Ablauf der T-Zell vermittelten Immunabwehr gegen Viren

T-Lymphozyten sind die Mediatoren der zellvermittelten Immunantwort. Sie können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen (kurz CTL). Die T-Helferzellen können weiter in Th1, Th2 und Th17 Zellen unterteilt werden. Für die Abwehr von Virusinfektionen spielen vor allem die Th1 und CTL eine wichtige Rolle (Abb. 3.1). Th1 sind in der Lage CTL zu aktivieren und die Prozessierung von Antigenen in antigen präsentierenden Zellen (kurz APCs) anzuregen. Am Ende steht eine Abtötung von virusinfizierten Zellen und damit die Eindämmung der Infektion.

Naive T-Helferzellen können Antigene nur dann erkennen, wenn sie von DCs auf

dem Major Histocompatibility Complex II (kurz MHC-II) präsentiert werden. Somit spielen DCs eine Schlüsselrolle in der zellvermittelten Immunantwort. Die naive DC nimmt das Antigen in der Peripherie auf und begibt sich in ein lymphatisches Organ. Der Kontakt mit dem Antigen bewirkt in der DC einen Prozess, der als Maturation bezeichnet wird. Dabei verändert sich die Rezeptordichte und Zusammensetzung auf der Oberfläche der DC, womit sich ihre Funktionalität weg von einer antigenprozessierenden Zelle, hin zu einer antigenpräsentierenden Zelle verschiebt. In der DC kommt es zur Spaltung des Antigens in Fragmente, die als Haptene bezeichnet werden. Diese binden im Rahmen der Prozessierung intrazellulär an MHC II Moleküle. Die mit Antigen beladenen MHC II Rezeptoren werden dann zusammen mit kostimulierenden Rezeptoren wie CD86 auf der Oberfläche der DC exprimiert. Erst jetzt kann das Antigen durch die T-Helfezelle erkannt werden. Das Zytokinmilieu beim Binden der naiven T-Helferzelle an ihr passendes Antigen entscheidet über die Differenzierung in Th1, Th2, Th17, T-Suppressor oder T-Gedächtniszelle. Eine Sekretion von IL-12 aus der DC führt zur Differenzierung der naiven T-Helferzelle zur Th1 Zelle. Th1 Zellen sezernieren unter anderem die Leitzytokine IFN- γ und IL-2. Dadurch erfolgt die Aktivierung von natürlichen Killerzellen, Makrophagen, B-Lymphozyten und CTL. Natürliche Killerzellen und CTL führen über verschiedene Mechanismen zur Apoptose und Zerstörung von virusinfizierten Zellen [15]. Über die Aktivierung von CTL spielen die Th1 Zellen somit auch eine entscheidende Rolle in der Abwehr von HIV. Durch das Vorgehen von CTL gegen infizierte Zellen wird der Übergang von der frühen Phase der HIV Infektion mit hoher Viruslast, zur Latenzphase mit moderater Viruslast bewirkt [38]. Dabei kommt es in der Frühphase zu einer starken Proliferation von CTL, mit der für dieses Krankheitsstadium typischen Lymphknotenschwellung. Die nach der Akutphase durch die CTL-Antwort erreichte Viruslast wird als "set point" bezeichnet und korreliert mit der Überlebensrate der Patienten [87]. Bei HIV-Langzeitüberlebenden findet man eine hohe Zahl HIV-spezifischer Vorläufer-CTL mit breiter Spezifität gegen verschiedenste Virusproteine. Im späteren Verlauf und bei Ausbruch der Immunschwäche lassen sich dem entgegen häufig sog. "Escape"-

Mutanten des Virus nachweisen, die von den CTL nicht effektiv erkannt werden können [22, 7]. Obwohl CTL für den Verlauf der Erkrankung nachweislich eine wichtige Rolle spielen, ist ihre Bedeutung für die Prävention einer Virusinfektion bisher nicht geklärt.

Einige T-Zellen differenzieren im Rahmen der T-Zellantwort zu sog. Gedächtniszellen. Diese verfügen im Vergleich naiven T-Zellen, aufgrund eines anderen Rezeptormusters, über erweiterte Fähigkeiten. Sie sind durch ein passendes Antigen auch außerhalb von lymphatischen Organen leicht aktivierbar. Dabei benötigen sie nicht zwingend den Kontakt zu DCs, sondern können auch durch andere APCs wie B-Zellen oder Makrophagen aktiviert werden. Ihr Sitz sind vor allem die peripheren Gewebe wie Schleimhäute, die vielen Erregern, so auch HIV, als Eintrittspforte dienen. Dadurch ermöglichen sie eine hochspezifische und prompte Reaktion auf Pathogene, mit denen das Immunsystem bereits Kontakt hatte [43].

3.2. Ursachen für die Ineffektivität der Immunantwort gegen HIV

3.2.1. Ursachen der ineffektiven zellulären Immunreaktion gegen HIV

Eine fortschreitende Infektion von Zellen durch das HIV kann durch das Immunsystem nicht effektiv verhindert werden. Dies beruht auf verschiedenen Mechanismen, welche die oben beschriebenen physiologischen Strategien der Immunabwehr vollständig oder teilweise außer Kraft setzten.

Zunächst wird, die für eine effektive zelluläre Abwehr wichtige Zellpopulation, der Gedächtniszellen initial infiziert. Verschiedene Prozesse (Apoptose, zytopathische Effekte) führen im Verlauf zum Untergang der infizierten Zellen, wodurch das Immunsystem empfindlich geschwächt wird. Ein Hauptübertragungsweg von HIV ist der Geschlechtsverkehr, wobei das Virus in das mukosa-assoziierten lymphatischen

Gewebe gelangt [11]. Dieses Gewebe ist der Sitz vieler DCs und $CD4^+CCR5^+$ T-Gedächtniszellen, die den Organismus vor dem Eindringen verschiedener Pathogene schützen sollen. In der Frühphase können bis zu 60% der T-Zellen in der Lamina propria infiziert sein [87]. Das mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe bietet dem Virus besondere Voraussetzungen für die Vermehrung: Das Virus liegt als sog. Provirus in der DNA inaktiver Zellen vor und kann erst reproduziert werden, wenn die Wirtszelle aktiviert und ihre DNA abgelesen wird. Im lymphatischen Gewebe herrschen im Vergleich zu anderen Geweben erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine. Diese führen zu einem vermehrten Ablesen der zellulären DNA und damit auch der Provirus-DNA. In mukosa-assoziiertem lymphatischen Gewebe werden deshalb besonders viele Viren von den aktivierten, infizierten Wirtszellen produziert.

Des Weiteren nutzt das Virus unter anderem DCs um sich im Körper weiter auszubreiten. Das Virus kann mit Hilfe des Oberflächenmoleküls DC-SIGN an DCs binden und wird so, ohne diese zu infizieren, von ihnen in lymphatische Gewebe transportiert [34]. Sowohl infizierte, als auch nicht infizierte DCs fungieren bei der Ausbreitung des Virus als eine Art "trojanisches Pferd". Sie übertragen eine letale Dosis an Viren auf die T-Zellen, während sie diese gleichzeitig aktivieren. So findet das Virus im Wirt die nötigen Voraussetzungen für die nun folgende Replikation [51].

Nicht nur T-Helfer Zellen und DCs sondern auch Monozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen sind von der Infektion betroffen. Da die infizierten APCs und inaktiven T-Zellen längere Zeit überleben, entsteht schon in frühen Phasen der Infektion ein Virenreservoir. Ist das Virus einmal in die DNA der Wirtszelle integriert, kann es dort vom Immunsystem nicht erkannt werden. Eine Eradikation der Infektion ist nach heutigem Kenntnisstand dann nicht mehr möglich. Die Phase in der das Virus extrazellulär vorliegt und so dem Immunsystem exponiert ist, ist kurz.

Während inaktive infizierte Zellen lange überleben, geht ein Großteil der infizierten aktivierten T-Zellen innerhalb weniger Tage unter. Dabei spielen sowohl direkte Prozesse (Induktion von Apoptose und zytopathische Effekte) als auch indirekte

Vorgänge (z.B. Zerstörung der infizierten Zellen durch CTLs) eine wichtige Rolle [87]. Während der Latenzphase der Erkrankung ist das Knochenmark in der Lage, das tägliche Absterben von schätzungsweise 10^8 - 10^9 $CD4^+$ T-Lymphozyten zu kompensieren. Erst nach Jahren, wenn die Regenerationskapazität des Knochenmarks erschöpft ist, kommt es zum Ausbruch von AIDS durch den Zusammenbruch der T-Helferzellantwort [82].

3.2.2. Ursachen der ineffektiven humoralen Immunreaktion

Um eine Neuinfektion weiterer Zellen mit Viren zu verhindern und nicht nur die Replikationsrate in schon befallenen Zellen zu reduzieren, bedarf es neutralisierender AK, die das Virus in der vulnerablen Phase vor dem Eindringen in die Wirtszelle binden. Auch hier ergeben sich bei der Infektion mit HIV besondere Problemstellungen. So zeigt das Virus eine hohe genetische und somit auch molekulare Diversität. Diese führt dazu, dass zwar AK gebildet werden, diese jedoch nur gegen einen Teil der Virusvarianten gerichtet sind, die innerhalb eines Organismus vorkommen. Durch die hohe Fehlerrate der RT können sich unter Selektionsdruck durch Medikamente oder das Immunsystem resistente "Escape"-Mutanten bilden [82]. So ist es dem Virus möglich, die humorale Immunantwort zu umgehen. Eine Zielregion für neutralisierende AK könnte die gut konservierte Oberflächenregion des ENV Proteins gp120 darstellen. Jedoch sind breit neutralisierende AK gegen diese Zielregion schwer zu induzieren. Als mögliche Ursache hierfür wird die Struktur des Zielproteins ENV angenommen [14]. Die konservativen Epitope der Bindedomäne des ENV Proteins gp120 liegen in einer Einbuchtung des Moleküls wodurch AK nur schwer binden können. Die konservativen Regionen wie die V3 Loop werden erst durch eine Konformationsänderung des gp120 während der Bindung an den CD4-Rezeptor für AK zugänglich [18, 81]. Die Zeitspanne für die Exposition der Epitope ist kurz. Zudem werden die konservativen Oberflächenmoleküle von ENV, die für die Bindung der AK wichtig sind, glykosyliert und damit maskiert [50].

4. Impfstoffkonzepte

Eine Vakzine gegen HIV sollte eine Infektion entweder verhindern, oder zumindest die Viruslast nach erfolgter Infektion senken und damit das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten. Um die Infektion zu verhindern bedarf es breit neutralisierender AK, die das Virus noch vor der Infektion der Wirtszelle binden. Um eine bereits erfolgte Infektion einzudämmen, müssen virusinfizierte Zellen durch CTL erkannt und abgetötet werden. Ein Impfstoff nutzt dabei immer die natürlichen Strategien zur Abwehr eines Erregers. Da sich diese (Kapitel 3.2.) im Fall von HIV besonders schwierig gestaltet, ist auch die Entwicklung einer effektiven Vakzine ein komplexes Problem, das bis heute noch nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte [46, 6].

4.1. Rekombinante Proteinkomponenten zur Induktion breit neutralisierender Antikörper

Analog zu anderen Impfstoffen wie zum Beispiel gegen Hepatitis B, ist auch im Fall von HIV 1 versucht worden, breit neutralisierende AK durch eine Vakzine zu induzieren. In einer Phase II Studie in Thailand wurden dazu gp120 Moleküle aus verschiedenen Virus-Clades als Impfstoff verwendet [67, 75]. Der von der Firma *Vax-Gen's* hergestellte Impfstoff AIDSVax konnte jedoch weder die Rate an Neuinfektionen, noch die Viruslast in infizierten Individuen senken [40]. Auch die Kombination des AIDSVax Impfstoffes mit einem rekombinanten Canarypoxvektor führte nur zu einer Effektivität des Impfstoffes von 26% bezüglich der Prävention von Neuinfektionen. Die Viruslast in neuinfizierten Individuen konnte auch hier nicht gesenkt werden [74].

4.2. Impfstoffe basierend auf attenuierten und rekombinanten Viren

Da sich die Strategie breit neutralisierende AK zu induzieren bisher nicht als erfolgreich erwies, stützt sich ein weiterer Ansatz auf die Induktion einer CTL Antwort gegen virusinfizierte Zellen. Dieser Ansatz könnte eine Infektion zwar nicht verhindern, jedoch zu einer Reduktion der Viruslast in infizierten Organismen führen. So könnte die Zerstörung von T-Helfer- und T-Gedächtniszellen eingedämmt und der Ausbruch der Immunschwäche verhindert werden. Zudem führen die hohen Viruslasten zu einem hohen Ansteckungsrisiko.

4.2.1. Impfstoffe basierend auf attenuierten Viren

Ein Impfstoffkonzept stellen attenuierte Viren dar, die gegen Erkrankungen wie Masern, Mumps und Röteln erfolgreich eingesetzt werden. Im Fall von HIV sind diese Impfstoffe wegen des Risikos einer Reversion zur Wildtypform nicht geeignet. Bedenken gegen einen solchen Ansatz warfen auch Versuche mit Makaken auf: Die Tiere waren mit attenuierten, dem HI-Virus eng verwandten SI-Viren geimpft worden. Eine Langzeitbeobachtung über bis zu 7 Jahre zeigte, dass initial gesunde, immunkompetente Affen im Verlauf an SIV erkrankten [73].

4.2.2. Impfstoffe basierend auf rekombinanten Viren

Dieses Risiko kann durch die Verwendung rekombinanter Viren umgangen werden. Dabei werden die entscheidenden Gene für die konservativen Proteine Gag, Pol und Env beispielsweise in nicht pathogene, attenuierte oder replikationsunfähige Adeno- oder Pockenviren integriert. Dieser Ansatz wurde in zwei plazebokontrollierten Phase II Studien erprobt [12, 76]. Geimpft wurde eine Kombination aus drei rekombinanten, nicht replikationskompetenten Adenoviren. In diese waren die Gene für die drei HIV-1 Proteine Gag, Pol und Nef integriert worden. Die sogenannte STEP Studie

(2004-2007) umfasste ein Kollektiv von 3000 freiwilligen Probanden in Nordamerika, in Südamerika, in der Karibik und in Australien. Zwar ließen sich in 73% der Geimpften HIV-1 spezifische CTL und in 41% HIV-1 spezifische CD4-T-Zellen nachweisen, dennoch konnte die Zahl der Neuinfektionen nicht gesenkt werden. Im Verumarm zeigten sich sogar mehr Infektion als im Plazeboarm. Es ließ sich zudem nicht ausschließen, dass die Infektion mit HIV durch eine starke Immunantwort auf das verwendete Adenovirus 5 begünstigt worden war. Auch die in Südafrika durchgeführte Phambili-Studie musste wegen der verwendeten Adenovirus 5 Vakzine abgebrochen werden [39]. Bessere Ergebnisse konnten in der kürzlich veröffentlichten RV144 Studie erzielt werden. 16 000 thailändische Probanden waren insgesamt vier Mal innerhalb von sechs Monaten mit einem rekombinanten Canary-Pox-Virus Impfstoff geimpft worden. Das rekombinante Virus kodiert unter anderem für Gag, Protease und Hüllproteine von HIV-1. Neuinfektionen im Verumarm konnten hierbei im Vergleich zum Plazeboarm um 33% gesenkt werden [24]. Ein teilweiser Schutz ist im Fall von HIV jedoch nicht ausreichend, da durch eine Impfung die Risikobereitschaft der Impflinge in Bezug auf ihr Sexualverhalten steigt [61].

4.3. Virus-like particles als mögliche HIV-Vakzine

Aufgrund des Bezugs zu der vorliegenden Arbeit sollen Virusähnliche Partikel (Zu Englisch: Virus-like particles, Abk.: VLPs) als Ansatz für eine Vakzine näher dargestellt werden. VLPs entstehen, wenn die gag-Gene in einer eukaryontischen Zelle exprimiert werden und das gag-Vorläuferprotein p55 gebildet wird. Andere virale Proteine sind für die Bildung von VLPs nicht nötig [23]. Das unprozessierte Vorläuferprotein lagert sich an die Plasmamembran an, und knospt aus der Wirtszelle aus. Dabei entstehen 100-120 nm große Partikel, die von einer Hülle aus Wirtszellmembran ummantelt sind [36]. Die Verwendung von VLPs bieten eine Reihe von Vorteilen. Sie sind nicht infektiös, beinhalten keine DNA oder RNA und bergen so im Gegensatz zu attenuierten Viren oder replikationsinkompetenten Viren wesentlich geringere Risiken.

Zudem kann mit ihnen sowohl eine humorale, als auch eine zelluläre Immunantwort induziert werden [52]. Dabei können über VLPs mehrere Antigene gleichzeitig präsentiert werden. In nicht essentielle Domänen des gag-Gens können dazu Sequenzen für andere virale Proteine integriert werden [23]. Es gibt Hinweise darauf, dass sich durch die Präsentation mehrere Antigene höhere Antikörpertiter und bessere CTL-Antworten erzielen lassen [78].

Die Herstellung ist kostengünstig und zur Produktion können verschiedenen Systeme wie Insektenzellen, Hefezellen oder Säugetierzellen verwendet werden [13, 36, 79]. Nach der Aufreinigung stehen die VLPs direkt als Impfstoff zur Verfügung. VLPs können auch als DNA-Vakzine verabreicht werden. Dazu kann das gag-Gen über Plasmid-DNA oder rekombinante Viren in den Organismus eingebracht werden. Die Zellen des Wirts produzieren daraufhin über einen längeren Zeitraum VLPs, wodurch das Immunsystem nachhaltiger stimuliert wird [23]. Der entscheidende Nachteil ist jedoch, dass die Konzentration der gebildeten VLPs meist nicht für eine intensive Immunantwort ausreicht.

VLPs können entweder mukosal oder systemisch appliziert werden. Auf die Mukosa aufgebracht, lösen sie dort zunächst eine lokale Immunantwort aus und werden dann über die Lymphe in die Lymphknoten gebracht, wo sie zu einer systemischen Immunantwort führen [90]. VLPs werden über Makropinozytose und Endozytose von APC aufgenommen und dann über MHC II Rezeptoren präsentiert, wodurch T-Helferzellen aktiviert werden [90]. Gleichzeitig gelangen Bestandteile der VLPs über das sog. "Cross priming" auch in den MHC I Signalweg der APC und können eine CTL Antwort induzieren. VLPs fungieren gleichzeitig als sog. "Gefahr-Signal", wodurch APCs aktiviert und zur Maturation angeregt werden. Durch die so bewirkte effektive Mediation einer Immunantwort, können VLPs im Vergleich zu anderen Impfstoffen auch in relativ geringerer Menge appliziert werden [23].

5. Zielsetzung dieser Arbeit

Trotz eines erheblichen Forschungsaufwandes ist es in den letzten 30 Jahren nicht gelungen, einen prophylaktischen Impfstoff gegen HIV zu entwickeln. Unter Umständen muss von der Idee Abstand genommen werden, eine HIV-Vakzine nach dem Modell bisher erfolgreicher viraler Vakzine entwickeln zu können. Da herkömmliche Mechanismen zur Immunabwehr viraler Erkrankungen im Falle von HIV nicht funktionieren, muss ein Impfstoff modifizierte Mechanismen zur Abwehr der Infektion nutzen. Um mögliche Mechanismen genauer zu untersuchen bedarf es fundamentaler Grundlagenforschung [46, 6].

In der Grundlagenforschung spielen Versuche an Kleintieren eine wichtige Rolle. Es ist dabei fraglich, ob die Wirklichkeit der HIV-Infektion im menschlichen Organismus durch die Vorgänge in genmanipulierten Kleintieren wie Kaninchen oder Mäusen hinreichend abgebildet werden kann. "In vitro" Modelle mit menschlichen Zellen stellen deshalb eine wichtige Ergänzung zu den Kleinterversuchen dar. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine Methode zu etablieren um potentielle Impfstoffkandidaten an primär gewonnenen humanen DCs und T-Zellen zu testen. Als Impfstoffkandidaten wurden aus den in Kapitel 4.3. beschriebenen Gründen VLPs herangezogen. Da die T-Helferzellantwort auf die effektive Antigenpräsentation durch DCs angewiesen ist, wurde zunächst das Aufnahmeverhalten von VLPs in DCs mit verschiedenen Methoden untersucht. Anschließend wurde ein bereits bestehendes Verfahren zum Priming naiver T-Zellen modifiziert und genutzt, um naive T-Zellen mit Hilfe von DCs gegen VLPs zu primen.

Teil II.

Material und Methoden

6. Methoden

6.1. Herstellung von HIV-VLPs

6.1.1. Das Bac-to-Bac Expressionssystem

Das "Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem" von *Invitrogen* dient der Produktion von Proteinen in Insektenzellen. Die DNA der Zielproteine wird dazu in mehreren Schritten in ein Baculovirus eingebracht, mit dem Insektenzellen infiziert werden. Das hier verwendete Protokoll folgte weitestgehend dem "Bac-to-Bac Usermanual" von *Invitrogen*. Abbildung 6.1. gibt einen Überblick über das System.

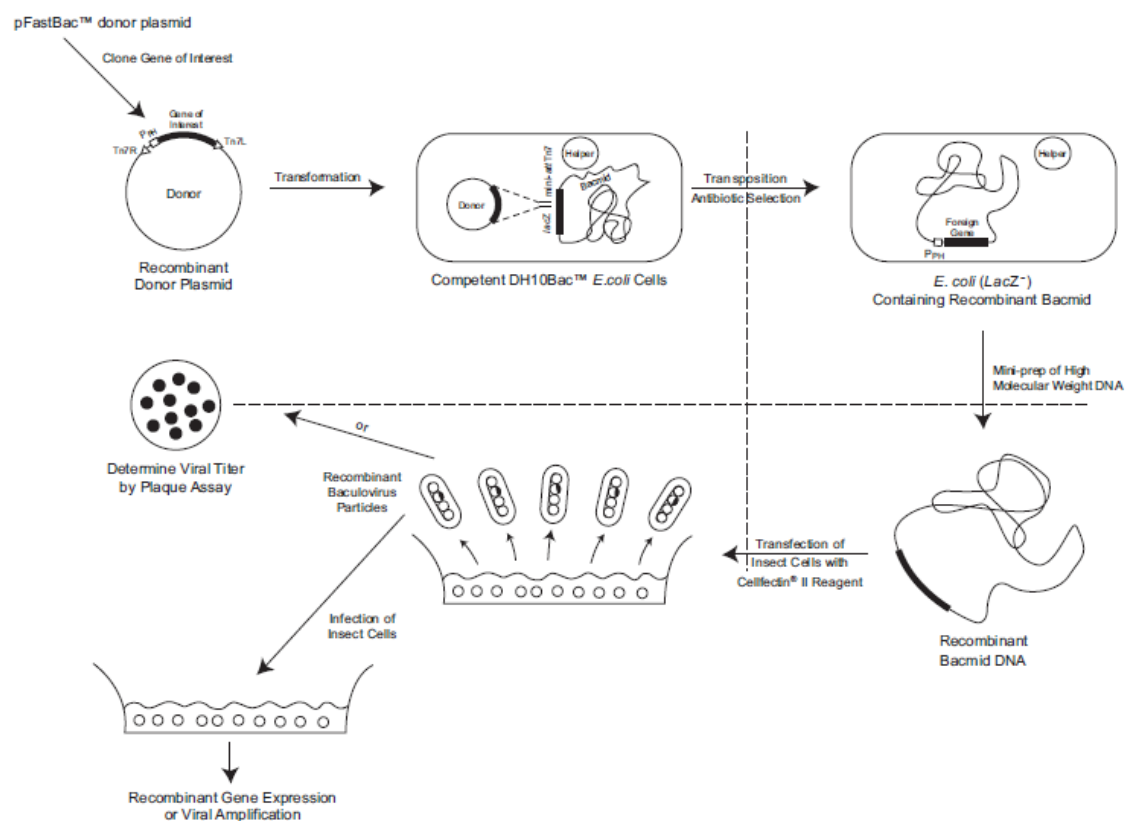


Abbildung 6.1.: (Reproduziert aus dem "Bac-to-Bac Usermanual" von *Invitrogen*) Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zum Einbringen von Fremd-DNA in die Baculovirus-DNA.

In einen vom Baculovirus abgeleiteten DNA-Vektor, der als Bacmid bezeichnet wird, werden mittels Transposition bestimmte Gensequenzen eingebracht. Das Bacmid enthält neben dem Baculovirusgenom Sequenzen, die für ein Kanamycinresistenzgen kodieren, eine geringe Anzahl an Kopien des Mini-F Replikons und ein Gensegment für das *LacZ α* -Peptid. In das N-terminale Ende der *LacZ α* -Gensequenz wurde ein Segment integriert, das die Bindungsstelle für das bakterielle Transposon Tn7 (mini-attTn7) beinhaltet. Tn7 unterbricht den Leserahmen des *LacZ α* -Gens nicht, so dieses es abgelesen werden kann. Das Enzym β -Galaktosidase entsteht. Tragen Bakterien das Bacmid und werden sie auf ein Agar mit chromogenem Substrat (z.B. Bluo-Gal) und dem Induktor IPTG (Isoprpyl- β -D-Thiogalaktopyranosid) aufgebracht, kann Bluo Gal durch das Enzym β -Galaktosidase gespalten werden und es entsteht ein blauer Farbstoff. Die Kolonien erscheinen blau. Wird hingegen mittels Transposition eine Gensequenz in die Tn7 Bindungsstelle eingebaut, wird der Leserahmen unterbrochen und die Kolonie verliert die Fähigkeit blauen Farbstoff zu produzieren. Sie erscheint weiß. Durch die Bebrütung auf Kanamycinagar sterben solche Bakterien, die kein Bacmid tragen ab, so dass die weißen Kolonien als Zielkolonien gelten können.

Fremdgene können im "Bac-to-Bac" System über eine Reihe von Schritten in der Tn7 Bindungsstelle der Bacmid-DNA plziert werden. Zunächst wird das gewünschte Fremdgen in das pFast Bac Donorplasmid kloniert. Dieses Plasmid wird dann in kompetente DH10Bac *E.coli* Bakterien transformiert, die ein Helferplasmid und das Bacmid tragen. Durch Unterstützung des Helferplasmids kann das gewünschte Gen vom pFastBac Donorplasmid auf das Bacmid übertragen werden. Dieser Vorgang geschieht mittels Transposition. Das Bacmid kodiert nun für ein Baculovirus in dessen Genom das Fremdgen integriert ist. Gleichzeitig wird durch die Transposition in die mini-Tn7-Bindungsstelle die Expression des *LacZ α* -Gens unterbrochen.

Die nach oben beschriebener Methode selektierten weißen Bakterienkolonien können in einer Flüssigkultur vermehrt und das Bacmid anschließend aufgereinigt werden. Transfiziert man nun Insektenzellen mit dem Bacmid, produzieren diese rekombinante Baculoviren. Diese Baculoviren können genutzt werden, um weitere Insek-

tenzellen zu infizieren, die daraufhin die auf dem Virus kodierten Gene ablesen und das Zielprotein -in diesem Fall HIV-Gag- produzieren.

6.1.2. Herstellung des rekombinanten Bacmids

Transformation und Vermehrung des pFastBac-TM Donorplasmids in DH5 α E.coli Bakterien

Im ersten Schritt erfolgte die Vermehrung des pFastBac Plasmids in kompetenten DH5 α -Bakterien (genetische Eigenschaften s. Anhang) mittels Transformation. Dazu wurden die bei -80°C gelagerten kompetenten E.coli Bakterien (DH5 α) 5 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Donorplasmid zugegeben und die Suspension für weitere 30 min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Hitzebehandlung für 45 sek bei 42°C und eine Inkubation auf Eis für 1 min.. Dann wurden 500 μ l S.O.C.-Medium (2% Tryptone; 0,5% Hefextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Gluco) zugegeben und die Bakteriensuspension für 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. In der Zwischenzeit wurden LB-Amp-Platten (10 g Bactotrypton; 10 g NaCl; 5 g Bactoyeast; 17 g Bactoagar; pH 7,5; 45 mg Ampicillin/l Medium) auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wurden die Bakterien in drei unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37°C . Nach 24 h zeigte sich als Indiz für die erfolgreiche Transformation ein selektives Wachstum ampicillinresistenter Bakterien auf den Platten. Möglichst kleine Einzelkolonien wurden für die Flüssigkultur ausgewählt und in jeweils 2 ml mit Ampicillin versehenes LB-Medium (5 g NaCl; 10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt ad 1l H₂O; pH 7,3) überführt. Das Wachstum erfolgte über Nacht auf dem Schüttelinkubator bei 37°C .

Puffer	Zusammensetzung
P1	50mM Tris/HCl, pH 8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml Rnase A
P2	200mM NaOH, 1%SDS (w/v)
P3	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5

Präparation und Aufreinigung von Plasmid DNA mittels "Rapid Lysis"(ohne Säulen)

Das Verfahren der "Rapid Lysis" ist geeignet, um kleine Mengen an DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse schnell aufzureinigen. Hier wurde der *QuickLyse Mini Prep Kit* der Firma *Quiagen* verwendet. 1,5 ml der Übernachtsbakterienkultur wurden in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min. mit einer *Eppendorf* Tischzentrifuge bei 4000 g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit jeweils 300 µl kaltem Resuspendierungspuffer (Puffer 1) und Lysepuffer (Puffer 2) aus dem "Quiagen Kit" resuspendiert und unter vorsichtigem Schwenken 3 min. inkubiert. Das SDS des Lysepuffers bewirkt ein Herauslösen von Proteinen und Phospholipiden aus der Zellwand und leitet so die Lyse ein. RNase aus dem Resuspendierungspuffer zerstört freiwerdende RNA. Durch im Puffer 2 enthaltene Natronlauge werden anschließend chromosomale- und Plasmid-DNA sowie Proteine denaturiert. Die chromosomale DNA denaturiert schneller, als die kleinere Plasmid-DNA. Stoppt man die Denaturierung nach 5 min mit 250 µl vorgekühltem Neutralisierungspuffer (Puffer 3) ab, ist die chromosomale DNA bereits zerstört, während die Plasmid-DNA noch erhalten ist. Nun können die chromosomalen DNA-Reste und die Proteine ausgefällt werden. Dazu wurde die Lösung für 30 Minute in einer Tischzentrifuge bei 21 000 g zentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde in ein *Eppendorf*-Reaktionsgefäß überführt, mit 630 µl Isopropanolol ausgefällt und für 30 min bei 21000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 70%-igem Ethanol gewaschen, wozu weitere 10 min bei 14000 g zentrifugiert wurde. Ein weiteres Mal wurde der Überstand abgekippt und das DNA-Pellet im Vakuum getrocknet, wonach es in 50 µl Tris Puffer resuspendiert wurde.

Kontrolle von Plasmid-DNA mittels Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA hinsichtlich ihres Molekulargewichts kann mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese bei konstanter Stromstärke und einer Spannung von 50V - 150V erfolgen. Für das Gel wurde 1% Agarose (SEKAM) in TBE-Puffer (40 mM Tris/HCL; pH 8,0; 20 mM Borsure; 20 mM EDTA) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde der Lösung das DNA-interkalierende Agens Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugesetzt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gegossen. Jeweils 10 µl der DNA Proben wurden mit 2 µl eines DNA-Auftragspuffers (Gel Loading Dye Blue (10x) *New England Bio Labs*) versehen und auf das Gel aufgebracht. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgröße wurden in eine der Geltaschen

5 µl eines DNA-Molekulargewichts-Standards 1 kb DNA Ladder (*New England Biolabs*) pipettiert. Die Laufzeit betrug eine Stunde, die Spannung 100 V.

Aufreinigung der Plasmid-DNA

Die mit der Größe des pFastBac Donorplasmids korrespondierende Bande wurde mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels "QIAquick Gel Extraction Kit" der Firma *Quiagen* aufgereinigt. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer kann dem Handbuch des Herstellers entnommen werden. Bei der "QIAquick Gel Extractions- Methode" wird die DNA selektiv unter Hochsalzbedingungen an eine Silikat-Säulenmatrix gebunden und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen mit 10 mM Tris/HCL pH 8,5 nach Angaben des Herstellers aus der Säulen eluiert. Zunächst wurde die ausgeschnittene Gelbande in ein Reaktionsgefäß (Cup) gegeben und in jeweils 500 µl QG-Puffer gelöst. Auf dem Heizblock erfolgte die Suspension des Gelstücks bei 50°C . Die Proben wurden dabei für 10 min bei 600 rpm geschüttelt. Die DNA Proben wurden anschließend auf "Qiaquick-Membranen" aufgebracht und erneut kurz bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Membranen wurden dann mit 750 µl PE Puffer (*Quiagen*) gewaschen und erneut zentrifugiert, wonach der Über-

stand verworfen wurde. Die DNA wurde in neue Cups überführt und mit Hilfe von 50 µl EB-Puffer (*Quiagen*) eluiert.

Quantifizierung der DNA mittels Nanodrop-Spektrophotometer

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde mit Hilfe eines ND1000 Nanodrop-Spektrophotometers (*Thermo scientific*) ermittelt. Verwendet wurde ein UV-Absorptions-spektrum zwischen 220 und 350 nm. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte aus dem Wert der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 258 nm (OD₂₅₈) die Konzentration der doppelsträngiger DNA (dsDNA) berechnet werden (1 OD₂₅₈. 47,5 /ml dsDNA).

Klonieren der HIV Gag-Gensequenz der Isolate 97CN001 und ZM 96 in das "pFastBac Donorplasmid"

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen lassen sich Plasmide an ganz bestimmten Stellen ihrer "Multiple Cloning Site" schneiden. Dabei werden für den Prozess des Umklonierens der insertkodierende Vektor und der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut. Die Erkennungssequenzen des Restriktionsenzymes bestehen meist aus 6 oder 8 pallindromisch aufgebauten Basenpaaren.

Beim Schneidevorgang entstehen sogenannte "sticky ends". Diese finden sich nun sowohl am Insert, als auch am Vektor und passen als komplementäre Basen aufeinander. So können in einem späteren Schritt mittels des Enzyms "Ligase" Vektor und Insert miteinander verbunden und das Vektorplasmid wieder geschlossen werden. Hier wurden die Enzyme Kpn I und XhoI der Firma *New England Biolabs* und die dazugehörigen Puffer verwendet. Als Plasmid diente das im "Bac-to-Bac-Kit" enthaltene pFastBac Donorplasmid. Dabei wurden 4 Plasmidproben des pFastBac Donorplasmid jeweils mit 0,5 µl Kpn I und XhoI verdaut. Der Verdau erfolgte für eine Stunde bei 37°C . Der Erfolg des Verdaus wurde anschließend mit Gelelektrophorese überprüft. Gleichzeitig wurden jeweils 3 µl des Inserts (Gag aus dem Isolat 97CN001 und Gag aus dem Isolat ZM96) mit jeweils 2 µl Kpn I und XhoI, 5 µl BE Puffer , BSA

und Wasser für 2h verdaut. Insert und Plasmid wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, nach dem in 6.1.2 beschriebenen Protokoll mittels der "QIAquick Gel Extraction-Methode" aufgereinigt und standen nun zur Ligation zur Verfügung.

Ligation von Plasmid und Insert zum rekombinanten pFastBac Donorplasmid

Für die Ligation sollte das molare Verhältnis von Vektor zu Insert zwischen 1:1 und 1:5 liegen. Hier wurden zwei rekombinante Plasmide erzeugt. Zum ersten wurden 4 µl des Vektorplasmids mit 8 µl des Inserts 97CN001-Gag inkubiert. Zum zweiten wurden 4 µl Vektor und 12 µl des Inserts ZM96-Gag ligiert. Des Weiteren enthielten die beiden Ansätze jeweils 2 µl des Enzyms T4-DNA-Ligase (*New England Biolabs*) und 2 µl T4 Ligasepuffer (20 mM Tris/HCL pH 7,6; 5 mM Dithiothreitol (DTT); 5 µg/ml Bovines Serumalbumin (BSA); 0,1 mM ATP). Anschließend wurden die Lösungen mit sterilem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt. Eine Leerprobe ohne Vektor und Insert diente als Kontrolle. Die Ansätze wurden über Nacht bei 12 °C inkubiert.

Transformation des rekombinanten Donorplasmids in DH5α E.coli Bakterien

Am nächsten Tag erfolgte die Transformation des rekombinanten Plasmids in DH5α E.coli Bakterien nach bereits oben beschriebener Methode. Über Nacht wuchsen auf LB-Platten unter dem Selektionsdruck durch Ampicillin nur diejenigen Bakterien, die das Plasmid mit der Resistenz gegen Ampicillin aufgenommen hatten. Von den Platten wurden jeweils 12 Einzelkolonien in Flüssigmedium mit Ampicillin überführt und für 24 h bei 37°C auf dem Schüttelinkubator kultiviert.

Aufreinigung der Plasmide mittels Mini Präparation von Quiagen

Zur Aufreinigung der rekombinanten Plasmide aus den je 6 Bakterienkolonien wurde eine "Mini Präparation" mit dem *Quiagen-Kit* durchgeführt. Die Aufreinigung folgte dem unter 6.1.2. beschriebenen Protokoll. Nach der Zentrifugation des Überstandes wurde die DNA diesmal jedoch auf voräquilibrierte Säulen pipettiert, die

in der Lage sind Plasmid DNA zu binden. Reste von RNA und Protein können mit einem PBS Waschpuffer von den Säulen abgewaschen werden. Um den Erfolg der Ligation nachzuweisen, wurden kleine Mengen der einzelnen Plasmide mit Kpn I und XhoI kontrollverdaut und die korrespondierenden DNA Fragmente mittels Gelelektrophorese nachgewiesen.

Transposition von Gensequenzen aus dem pFastBac Donorplasmid in das Bacmid der DH10 Bac Bakterien

Für die Transposition des rekombinanten Donorplasmids pFASTBAC wurden *MAX Efficiency DH10Bac* Zellen aus dem "Bac-to-Bac Kit" benötigt. Sie enthalten das Bacmid bMON14272 und das Helferplasmid bMON7124. Auf dem Bacmid ist die mini-att Tn7 Targetstelle kodiert. Das Bacmid enthält nach Ablauf der Transposition in diese Targetstelle die Fremdgene des rekombinanten Plasmids. Vor die "Multiple Cloning Site" des Plasmids mit den eingebrachten HIV-Gag-Gensequenzen ist der baculovirus-spezifische Polyhedrin-Promoter geschaltet, der das Ablesen des rekombinanten Virus in Insektenzellen ermöglicht. So entstehen nach der Transformation des rekombinanten Bacmids in die Insektenzellen Viren, die wiederum genutzt werden können, um weitere Insektenzellkulturen zu infizieren. Die Insektenzellen produzieren dann das gewünschte Zielprotein, in diesem Fall HIV-Gag zweier verschiedener Virusisolate. Hier erfolgte zum einen die Transposition der Gensequenz für Gag aus dem Isolat 97CN001 und zum anderen aus dem Isolat ZM96 in das Bacmid der DH10Bac Zellen (genetische Eigenschaften s. Anhang). Dafür wurde jeweils 100 µl Zellsuspension mit einem Nanogramm des entsprechenden Donorplasmids inkubiert. Um die Aufnahme des jeweiligen Donorplasmids in die kompetenten DH10Bac Zellen zu ermöglichen, wurden die Zellen für 30 min. auf Eis gelagert und dann für 45 s bei 42°C inkubiert. Nach weiteren 2 min. auf Eis wurden je 900 µl S.O.C. Medium zugegeben und die Proben für 4 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspension 10-fach, 100-fach und 1000-fach verdünnt.

Jeweils 100 µl jeder Verdünnung wurden auf speziellen Luria Agar Platten (50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracycline, 100 µg/ml Bluo-gal, 40 µg/ml IPTG) ausgestrichen. Die Bakterien wurden für 48 h bei 37°C kultiviert. Nach 48 h wurden jeweils 8 möglichst gut abgrenzbare, kleine, weiße Kolonien für jedes der beiden Gag-Isolatklone ausgewählt und über Nacht auf Luria Agar Platten kultiviert. Daraus wurden dann 12 Kolonien verlesen und über Nacht in einer Flüssigkultur bei 37°C bebrütet.

Isolation des rekombinanten Bacmids und Qualitätskontrolle mittels PCR und Sequenzierung

Die Aufreinigung des Bacmids folgte der unter 6.1.2 beschriebenen Methode. Zur Kontrolle der eingebrachten HIV Sequenzen aus dem Donorplasmid wurde eine PCR (Zu Englisch: "polymerase chain reaction"; kurz: PCR) der Sequenzen mit speziellen Primern durchgeführt. Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Dabei wird durch Erhöhung der Temperatur auf 90° C die Doppelstrang DNA denaturiert. Nach raschem Abkühlen auf etwa 50°C binden zugesetzte Primer. Diese sind zur Sequenz des 3'-Endes des DNA-Stückes komplementär, das amplifiziert werden soll. Um unspezifische Hybridisierung zu verhindern, muss hierbei die Temperatur auf 60°C -70°C erhöht werden. Durch Zusatz einer DNA TAQ-Polymerase aus thermophilen Bakterien, werden die beiden Einzelstränge zum jeweiligen Doppelstrang komplementiert, sodass erneut zwei Doppelstränge entstehen. Die Replikationszyklen können beliebig oft wiederholt werden und führen so zu einer exponentiellen Zunahme der zu amplifizierenden DNA Sequenz. In diesem Fall wurden zur Replikation des spezifischen HIV-gag-Sequenzen die Oligonukleotidprimer M13-21 (Forward Primer) und M13 (Reverse Primer) ausgewählt. Jeweils 5 µl der Primer wurden mit 1 µl Bacmid-DNA, 15 µl PCR Mix (PCR Master Mix Firma *Promega*) und 4 µl Wasser zu einem 30 µl umfassenden Ansatz pipettiert. Die PCR Proben wurden für 3 min bei 93°C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Proben in den Cylcer (Mastercycler gradient; Firma *Eppendorf*) verbracht.

Bezeichnung	Sequenz (5'...3')	Funktion
M13-21	TGTAAACGACGGCCAGT	Vorwärtsprimer
M13	CAGGAAACAGCTATGAC	Rückwärtsprimer

Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen nach folgendem Schema: 94°C für 45s, 55°C für 45s, 72°C für 5 min. Die PCR -Produkte der HIV Sequenzen der beiden Bacmide B1 (mit gag 97 CN001) und B2 mit (gag ZM 96 wurden) wurden anschließend mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

Um nach erfolgreichem Nachweis der Gensequenzen für für 97 CN001 und ZM 96 Gag genaueren Aufschluss über deren Lokalisation auf dem Bacmid zu erhalten wurde eine Sequenzierung durch die Firma *Genart* (Regensburg, Deutschland) durchgeführt.

6.1.3. Herstellung des rekombinanten Baculovirus

Kulturhaltung von Sf9 Zellen

Sf9 Zellen sind eine immortalisierte Insektenzelllinie, die aus Ovarzellen der Motte *Spodoptera frugiperda* gewonnen wurde. Diese Zellen können zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt werden. Für die Kultur der Sf9 Zellen wurden hier zunächst Zellen aufgetaut (Josef Köstler, 21.04.2008) und in 75 cm² Kulturflaschen mit 12 ml vorgewärmtem TC 100 Medium der Firma *Invitrogen* (mit 10% FKS und 1% Penicillin / Streptomycin) überführt. Die Kultivierung erfolgte über 3 Tage bis zur optischen Dichte. Dann wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 geteilt und wiederum in jeweils 12 ml Medium aufgenommen. Dann wurden die Zellen in 75 cm² Flaschen überführt. Alle drei bis vier Tage wurde eine Subkultivierung durchgeführt.

Transfektion der Sf9 Zellen

Nach der M13-PCR zum Insertnachweis mit Darstellung der erwarteten DNA-Bande im Agarosegel, wurden Sf9 Insektenzellen mit der rekombinanten Bacmid DNA transfiziert. Dazu wurde das Prinzip der Lipofektion genutzt. Eine als "Cellfectin" (Firma

Invitrogen, Katalognummer 10362-100) bezeichnete Lösung bildet dabei lipophile Vesikel um die negativ geladene DNA. Diese kann so durch die Zellmembran in die Zellen gelangen. Dort kann die Fremd-DNA abgelesen und entsprechendes Protein oder- wie in diesem Fall- ein Virus produziert werden. Für die Transfektion wurden Sf9 Zellen in Reagenz Röhrchen überführt und bei 1200 rpm 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit der Zählkammer ausgezählt. Jeweils 9×10^5 wurden dann in 2 ml TC 100 Medium ohne Antibiotika in die Felder einer 6-Napfplatte ausgesät und für 1h bei 24°C bis zu Adhärenz inkubiert. Um die isolierte Vermehrung der beiden verschiedenen rekombinanten Baculoviren für die Gag Isolate 97CN001 und ZM96 zu ermöglichen, wurden zwei separate Kulturplatten verwendet. Für jedes der HIV-gag Isolate wurden nun aufgereinigte Bacmidproben von jeweils 6 verschiedenen Bakterienkolonien für die Transfektion ausgewählt. Von diesen jeweils 6 Bacmid-DNA Proben wurden jeweils 5 µl entnommen und in insgesamt 12 Eppendorf Cups mit 100 µl TC 100 Medium ohne Antibiotika vermengt. In 12 weiteren Cups erfolgte die Suspension von 6 µl Cellfectin Lösung ("Bac-to-Bac"-Kit der Firma *Invitrogen*) in 100 µl TC 100 Medium ohne Antibiotika. Anschließend wurden die 12 Ansätze der DNA Suspensionen in die 12 Cups mit Cellfectinsuspension überführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde TC 100 Medium von den Sf9 Zellen abgenommen und durch 600 µl TC-100 Medium ohne Antibiotika ersetzt. Auf jedes der 6 Napfplattenfelder wurde der Transfektionsansatz eines der Bacmid DNA Klons getropft. Es folgte eine 5-stündige Inkubation bei 27°C . Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit jeweils 2 ml TC 100 Medium (mit Penicillin Streptomycin und 10% FKS) versehen und 72 h lang bei 27°C inkubiert.

Detektion spezifischer baculoviraler Proteine mit Hilfe monoklonaler AK im ECL-Western-Blot

Nach 72 h wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Napfkulturplatten gelöst, in ein *Eppendorf*-Reagenzgefäß überführt und für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Baculoviren verblieben in den Überständen. Diese wurden in

neue Reagenzgefäße pipettiert und zur Lagerung bei 4°C in einen Kühlschrank verbracht. Das Zellpellet wurde in 50 µl PBS Puffer gelöst und anschließend für weitere Analysen bei -20°C eingefrohren.

Die Kontrolle der entstandenen Viren erfolgte mittels "Enhanced chemiluminescence Western blotting" (kurz ECL-Western Blot). Der Western Blot ist eine Methode, mit der Proteine in einer Probe spezifiziert werden können. Dazu werden die Proteine zunächst mittels SDS (kurz für "sodium dodecyl sulfate") denaturiert und sind dann negativ geladen. Dadurch können sie im Gel unbeeinflusst von ihrer Ursprungsladung der Größe entsprechend aufgetrennt werden. Kleine Proteine legen im Gel in der gleichen Zeit größere Strecken zurück, als große Proteine, da sie sich leichter durch die Maschen des Polyacrylamid Gels bewegen können. Vom Gel werden die aufgeschlüsselten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt, wo sie mittels spezifischer farbmarkierter AK sichtbar gemacht werden können. In diesem Fall wurde ein Verfahren mit zwei AK verwendet. Der erste AK war gegen das baculovirale Hüllprotein gp64 gerichtet, das dem Nachweis einer erfolgreichen Virusproduktion diente. Der zweite AK richtete sich gegen den ersten AK. Der zweite AK ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert. Diese ist in der Lage das cyclische Diacylhydrazid Luminol zu oxidieren. Dieses fällt dadurch von einem angeregten Zustand in den Grundzustand zurück, wobei es Licht emittiert, ein Vorgang der als "Lumineszenz" bezeichnet wird. Das Licht kann mit einem speziellen Gerät detektiert werden und dient als Nachweis für das Vorhandensein des mit AK 1 markierten Proteins.

Im ersten Schritt wurde ein 10%-iges Trenngel vorbereitet. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist der untenstehenden Tabelle zu entnehmen. Während dieses aushärtete, wurden die Zellproben aus der Transfektion aufgetaut und denaturiert. Die Sf9 Zell-Proben wurden hierfür mit 50 µl 2x Boiling Mix aus Lämmli-Puffer und Beta-Mercaptoethanol vermengt und anschließend für 3 Minuten auf dem Heizblock bei 95°C inkubiert. Auf das Trenngel wurde eine ca. 1 cm dicke Lage Sammelgel gegossen. Nach dem dieses ausgehärtet war, wurden die Proben (jeweils 35 µl) in

präformierte Geltaschen eingebracht. Dabei dienten 5 µl "PageRuler Prestained Protein Ladder" (Firma *Fermentas*) als Standard. Die Stromstärke betrug bis zum Übertritt der Proben 50 mA, danach wurde sie auf 80 mA erhöht. Die Laufzeit betrug 1,5 h. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Gele vorsichtig von den beiden Glasplatten gelöst. Chromographypapier der Firma *Whatman* (Fließpapier) und die Nitrocellulosemembran wurden in Transferpuffer der Firma *BIO RAD* (29 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) getränkt. Anschließend wurde das jeweilige Gel mit aufliegender Nitrocellulosemembran zwischen Fließpapier gebettet und in ein Western-blot Gerät (*BIO RAD*) gelegt. Bei 0,45 mA folgte die Überführung der gröbenseparierten Proteine auf die Nitrocellulosemembran. Nach einer Stunde wurden die Membranen in einem Gemisch aus 100 ml PBS und 5 g Milchpulver bei 5°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Durch das Milchpulver werden die Bindungsstellen für Proteine auf der Membran gesättigt, so dass später die AK nur spezifisch an ihr Protein binden. Es folgten nun 2 Waschschrte mit PBS/Tween Puffer (10 mM NaPO₄; 0,15 M NaCl; 0,05 % Tween-20; pH 7,5) und ein Waschschrte mit PBS Puffer. Anschließend wurden die Membranen für eine halbe Stunde mit dem AK 1 (Purified Anti-Baculovirus-envelope gp64 protein, Clone: AcV5) in einer Verdünnung von 1:1000 mit TTBS (kurz für tween-tris buffered saline; Zusammensetzung: 150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; 0,02 M Tween 20; pH 7,5) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wiederholten sich die eben genannten Waschschrte. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten AK in einer Verdünnung von 1:5000. Es schlossen sich weitere Waschschrte (3x waschen je 5 min.; 2x PBS/Tween; 1x PBS) an. Dann wurden die Membranen mit "West Pico Substrat" (Firma *Thermo Scientific*) überschichtet und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Detektionsreagenz auf die Blotmembran aufgebracht (2 ml pro Blot). Die Auswertung erfolgte mit dem Chemiluxgerät nach 5 min Einwirkzeit.

Bestandteile	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
30% Acrylamid-0,8% Bisacrylamid- StammLösung	7,5 ml	0,99 ml
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	3,6 ml	-
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,2 ml
0,5% SDS-Lösung	3,6 ml	1,2 ml
H ₂ O bidest	3,3 ml	2,61 ml
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethyldiamine)	15 µl	6 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	90µl	30µl

Ernte der Viren und Aufstockung der Viursbestände

Zur Amplifikation rekombinanter Baculoviren wurden in 10 ml Zellkulturmedium 2×10^6 Sf9 Zellen ausgesät. Um die Viren zu gewinnen wurden die Überstände aus der Sf9 Kultur abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Die Überstände wurden für 5 min bei 500 g zentrifugiert, dann in frische Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Produktion von VLPs, Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation und Quantifizierung mittels Coomassie Gel

Nach erneuter Aussaat von 9×10^5 Zellen pro 6-Napfplatte wurden die Zellen mit 0,5 µl der jeweiligen Überstände zweier Viruskclone infiziert. Nach drei Tagen konnten die VLPs aus dem Überstand der Sf9 Kultur mittels Ultrazentrifugation (kurz UZ) geerntet werden. Dazu wurden die Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und 14 min bei 4°C und 3000 g zentrifugiert. Die Zellen selbst wurden verworfen. Die Überstände wurden in 50 ml Ultrazentrifugenröhrchen der Firma *Beckmann* überführt und mit 5 ml kalter Saccharose (30 Gewichtsprozent) unterschichtet. Die Proben wurden austariert und dann mittels Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge; SW32Ti Rotor, Beckman; 2 h bei 99000 x g, 4°C) pelletiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände verworfen. Auf das Pellet wurden je 200 µl PBS_{ohne} (kurz für "Phosphat gepufferte Saline ohne bivalente Ionen"; Zusammensetzung: 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄) pipettiert, dann wurden die Zentrifugenröhrchen über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert um das Pellet quellen zu lassen. Die VLPs konnten anschließend durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und zur Lagerung bei 4°C in *Eppendorf-Reaktionsgefäße* überführt werden.

Die Gelelektrophorese folgte dem unter 6.1.3. beschriebenen Aufbau für den Western Blot. Im Gegensatz zum Western Blot werden die Proteine bei der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Coomassie Gel jedoch nicht auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Sie verbleiben bei dieser Methode im Gel, dass mit Coomassie Blau angefärbt wird. So wurde auch hier verfahren. Zur Quantifizierung der VLPs wurden jeweils 2,5 µl, 5 µl und 10 µl der VLPs mit definierten Mengen BSA (5 µg ,10 µg ,20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg) auf Gele aufgebracht und dann dazu ins Verhältnis gesetzt. Als Standard diente Page Ruler Ladder Standard. Nach einem einstündigen Lauf bei 100 V wurden die Gele für 30 min in einer Färbelösung (45% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,25% Coomassie Brilliant Blau R250) und dann in Entfärbelösung (45% Ethanol, 10% Essigsäure) auf dem Schüttler inkubiert. Nach ca. 30 min waren die Proteinbanden deutlich sichtbar und die Gele konnten in Folie gelegt und eingeskannt werden.

Anschließend wurden sie mit der "Gel-Pro Analyzer Software" von *Media Cybernetics* vermessen, mit der aus den BSA Referenzbanden auf die Proteinkonzentration der VLPs Proben rückgeschlossen werden konnte.

6.2. Untersuchung der Aufnahme von VLPs durch DCs

6.2.1. Untersuchung der Präsentation von mammalian VLPs durch DCs

Generierung von DCs aus CD14⁺ Zellen

Aufreinigung von peripheren mononukleären Zellen aus Spenderblut

In den folgenden Experimenten wurden DCs verwendet, die nach dem hier beschriebenen Protokoll aus dem Blut verschiedener Spender isoliert wurden. Im ersten Schritt erfolgte die Isolation von CD14⁺ Zellen aus PBMCs (kurz für peripheral blood mononuclear cells). Dabei wurden zunächst die mononukleären Zellen mit Hilfe einer isopyknischen Zentrifugation von Zelltrümmer und Erythrozyten getrennt. Im nächsten Schritt erfolgte die Isolation von CD14⁺ Zellen aus der Gesamtheit der PBMCs mittels des Verfahrens der "Magnetic Cell Separation" (kurz: MACS) der Firma *Miltenyi Biotec*.

Jedem der Spender wurde eine Menge von 50 ml Blut entnommen, wobei ein Gerinnen durch die Zugabe von Heparin verhindert wurde. Das gewonnene Blut jedes Spenders wurde unter der sterilen Werkbank auf je 2 50 ml *Falcon*-Reagenzgefäße aufgeteilt und mit Puffer P2 (Zusammensetzung: PBS_{ohne} mit 2% FKS) erneut auf 50 ml aufgefüllt. In je 4 weitere 50 ml Röhrchen wurden je 25 ml Ficoll (Hersteller: *Pan-biotech*) für eine Dichtestufengradientenzentrifugation (DZ) vorgelegt. Bei der DZ wird Blut auf einen Ficollgradienten aufgelagert. Ficoll, ein Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, hat dabei eine geringere Dichte als Erythrozyten, jedoch eine größere Dichte als Monozyten und Lymphozyten. Zentrifugiert man die Proben mit dem auf Ficoll aufgelagerten Blut für 30 min bei 1000 g ohne Bremse, so bilden sich vier verschiedene Phasen. Durch die Zentrifugation wandern Zelltrümmer und Erythrozyten, die dichter sind als das Ficoll, auf den Boden des Röhrchens. Über dem Ficoll bildet sich eine Interphase, die Lymphozyten und Monozyten enthält. Über diesem weißen Ring aus Zellen bildet sich eine vierte, breite Phase aus Serum. Mit einer Pasteur

Pipette kann nach erfolgreicher Zentrifugation die Interphase mit den mononukleären Zellen abgenommen und für die Weiterbehandlung in ein 50 ml-Röhrchen überführt werden. So wurde auch hier verfahren. Es erfolgte das MACS von CD14⁺-Zellen aus der Gesamtheit der PBMCs.

”MACS-Verfahren” und Kulturhaltung von CD14⁺ Zellen

Das ”MACS-Verfahren” ist eine Methode, bei der bestimmte Zellpopulationen über Oberflächenmarker aus der Gesamtheit der im Blut enthalten Zellen separiert werden. Im folgenden Protokoll wurden die Puffer und Verbrauchsmaterialien soweit nicht anders vermerkt aus dem ”MACS cell separation Kit” der Firma *Miltenyi Biotec* entnommen. Die zu separierenden Zellen werden bei dieser Methode mit spezifischen, paramagnetischen Partikeln (MACS *Mikro Beads*) markiert, und auf eine Trennsäule gegeben, die ihrerseits in einem starken Magneten befestigt ist. Im Magnetfeld der Säulen werden markierte Zellen zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Säulen passieren. Wird die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt, können die zurückgehaltenen Zellen abgespült und in Medium überführt werden.

Die zuvor gewonnenen PBMCs wurden in Vorbereitung auf diese Verfahren zwei Mal mit Lysepuffer (Puffer P2 der Firma *Quiagen*) gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension mit dem Doppelten ihres eigenen Volumens an Puffer P2 aufgefüllt und 10 min. bei 300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Zellpellet in mit 800 µl ”MACS-Puffer” aus dem ”MACS Cell Separation-Kit” der Firma *Miltenyi* resuspendiert. Nun wurden 50 µl CD14 Mikro Beads aus dem Kit zugegeben und die Probe gevortext. Es erfolgte die Inkubation der Zellen für 15 min. im Kühlschrank.

Der Magnet wurde in der Zwischenzeit mit drei MS Säulen (*Miltenyi*) bestückt, die anschließend mit 500 µl ”MACS-Puffer” gespült wurden. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Zellsuspension auf die Säulen gegeben. Im Anschluss daran wurden die Säulen 3× mit je 500 µl ”MACS-Puffer” gespült, aus dem Magneten entfernt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß gestellt.

Auf die Säulen wurde 1 ml "MACS-Puffer" aufgebracht, der mit einem Stempel schnell durch die Säulen gedrückt wurde, um die dort gebundenen CD14⁺ Zellen abzuspülen. Aus dem so gewonnenen Milliliter der Zellsuspension wurden 30 µl für eine Zählung entnommen, der Rest der Zellen wurde für 10 min. bei 300 g zentrifugiert, in Medium überführt und bei einer Dichte von 1 Mil./ml in Kulturflaschen ausgesät. Nach der Zugabe von IL-4 und GMCSF (jeweils in einer Konzentration von 500 U/ml) wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C bebrütet. Nach drei Tagen erfolgte jeweils ein Mediumwechsel in der Kultur. Dazu wurde die Hälfte des Mediums abgenommen. Die Zellen wurden 10 min bei 300 g abzentrifugiert und in einer korrespondierenden Menge neuem Medium mit GMCSF und IL-4 resuspendiert. Am Tag 5 konnten die ausdifferenzierten DCs für die verschiedenen Versuche herangezogen werden.

Aufbereitung von autologem Serum

Teilweise wurden DCs in Medium mit autologem Serum kultiviert. Dazu wurde nach der DZ das Serum des entsprechenden Spenders abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das Serum wurde 30 min lang bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die hitzedenaturierten Proteine in einem Zentrifugationsschritt (30 min, 4000 g) precipitiert. Der Überstand wurde steril filtriert (0,22 µm Syringe-Filter). Das Serum wurde dann zur Lagerung bei -20°C in den Gefrierschrank verbracht.

Produktion von mammalian VLPs

Kultur der 293 F Zellen

Bei den 293 F Zellen (FreeStyle 293-F Cells, *Invitrogen*) handelt es sich um eine Zelllinie, die immortalisierten menschliche embryonalen Nierenzellen entstammt. Die Zellen sind gut kultivier- und transfizierbar. Hier wurden sie in "D-MEM-Medium" (kurz für : Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Firma *GIBCO*) unter Zusatz von 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C auf eine Gesamtmenge von 360×10^6 Zellen

vermehrt. Anschließend wurden die Zellen auf zwölf 125 ml Plastik Erlenmeyerkolben aufgeteilt und auf eine Menge von 1×10^6 lebende Zellen pro Milliliter Medium eingestellt. Je 30×10^6 lebende Zellen wurden nun pro Kolben in 30 ml Medium ohne Antibiotika ausgesät.

Transiente Transfektion von 293 F Zellen mittels Polyethylenimin

Für die Transfektion der 293 F Zellen wurde Polyethylenimin verwendet (kurz PEI; [85]). Polyethylenimin ist ein kationisches Polymer, das DNA zu 0,2 - 0,5 μm großen Partikeln verdichtet. Durch Endozytose werden die so entstandenen DNA-Partikel in die Zellen aufgenommen. Dort akkumulieren sie in den Endolysosomen, bis diese schließlich platzen und die DNA ins Zytoplasma freigeben. PEI sorgt für einen Weitertransport der DNA in den Zellkern, wo die eingebrachten Gene schließlich exprimiert werden. Für die Transfektion der 293 F Zellen wurden die Zellen in "FreeStyle-Medium" (*Gibco* ohne Antibiotika) überführt. Anschließend wurden die Transfektionsansätze erzeugt. Dazu wurden für jeden der zu transfizierenden Kolben (6 Kolben für den ZM96-DNA-Vektor und 6 Kolben für den 97CN001-DNA-Vektor) jeweils 37 μg DNA mit 900 μl JET-PEI in 1350 μl D-MEM-Medium gelöst. Die DNA bestand aus dem Vektor pcDNA3.1, einem Plasmid mit CMV Promotor, in das die Gensequenzen für das Gag-Protein der Isolate 97CN001 und ZM96 integriert waren.

Die Ansätze wurden für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie tröpfchenweise zu den Zellen gegeben wurden. Es folgte eine Inkubation der transfizierten 293 F Zellen auf dem Schüttler für 4 h bei 37°C . Nach 4 h wurden die Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dann bei 300 g für 10 min. zentrifugiert. Die Zellen wurden resuspendiert und in je 40 ml "FreeStyle Medium" (Firma *Gibco*) unter Zusatz von 0,5 % Penicillin/Streptomycin pro Kolben überführt. Es folgte eine Kultur für 3 Tage bei 37°C , 8 % CO_2 und 130 rpm auf dem Schüttler.

Aufreinigen der VLPs mittels Ultrazentrifugation

Nach 3 Tagen konnten die VLPs aus dem Überstand der 293 F Zellkultur geerntet werden. Dazu wurden die Zellen in 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und 14 min bei 4°C und 3000 g zentrifugiert. Die Zellen selbst wurden verworfen. Die Überstände wurden nun in 50 ml UZ-Röhrchen überführt und mit 5 ml kalter Saccharose (30 Gewichtsprozent) unterschichtet. Die Röhrchen wurden austariert und dann bei 99.000 g für 2 h bei 4°C ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände verworfen. Auf das Pellet wurden je 200 µl PBS_{ohne} pipettiert, dann wurden die Proben über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert um das Pellet quellen zu lassen. Am nächsten Tag wurden die VLPs dann mittels Coomassie Gel quantifiziert. Dazu wurden Proben von je 17,5 µl entnommen. Die Restlichen VLPs wurden zur Lagerung bei -20°C gelagert.

Färbung von VLPs mittels CFDA

CFDA (kurz für 5-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester) ist ein membrangängiger Farbstoff, der im Zytoplasma an Proteine bindet, ohne die Zellfunktion zu beeinträchtigen. Erst durch die Abspaltung zweier Azetatgruppen wird CFDA in das fluoreszente Carboxylfluorescein- Succinimidyl Ester (CFDA-SE) umgewandelt. Regt man den Farbstoff mit Licht der Wellenlänge 488 nm an, emittiert er Licht einer Wellenlänge von 517 nm, das mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusssy-tometrie detektiert werden kann. Hier wurde CFDA verwendet um VLPs zu markieren und deren Aufnahme in DCs zu untersuchen.

Für die Färbung wurde zunächst eine 100 µM CFDA Verdünnung hergestellt. Für die Versuche wurden VLPs verwendet die mit Hilfe von Vektoren in 293 F Zellen hergestellt wurden, welche zum einen für das Gag-Protein des Virusisolates 97CN001 kodierten und zum anderen für das Gag-Protein des Isolates ZM96. 50 µg der VLPs wurden jeweils mit PBS auf 150 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dazu wurden dann 37,5 µl der 100 µl CFDA Lösung pipettiert. Als Negativkontrolle dienten 100 µg BSA und eine Probe mit PBS. Die Proben wurden für 1 h in Dunkelheit und bei

Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 9 ml aufgefüllt. Die UZ folgte dem unter 6.1.4. beschriebenen Ablauf.

Untersuchung der Aufnahme CFDA-markierter VLPs in DCs mittels Fluoreszenzmikroskopie

An Tag 5 nach der Generierung wurden DCs aus der Kulturflasche in 50 ml Reagenzröhrchen überführt. Durch mehrmaliges, vorsichtiges Abspülen des Flaschenbodens mit der Pipette wurden auch adhärente Zellen gelöst. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur (kurz RT) und 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in DC-Medium resuspendiert und die Zellen mit der Zählkammer gezählt. Je 500 000 Zellen wurden in 500 µl auf eine 24-Napfplatte aufgebracht. Nach Aufbringen der VLPs wurden die DCs für 8 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und dann mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mikroskopiert und photographiert (Kamera: Sony DSC-S75). Anschließend wurden die Zellen in 5 ml-FACS-Röhrchen überführt, in 2 ml FACS Puffer (PBS mit 1% FKS und 0,1% Na₃N) aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 300g, 4°C). Das entstandene Pellet wurde in 200 µl FACS Puffer resuspendiert.

Untersuchung der DCs mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung und Quantifizierung von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen zuerst aus einer Suspension aufgesaugt. Es wird nun eine laminare Strömung erzeugt, in der die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung einzeln hintereinander aufgereiht werden. So durchlaufen die Zellen einen optischen Messbereich, in dem jede Zelle mit einem gebündelten Argon-Laserstrahl angestrahlt wird, dessen Emissionsmaximum bei 488 nm liegt. Detektoren messen nun genau, wie stark und in welche Richtung das Licht an den Zellen gestreut wird. Über die aufgenommenen Messwerte kön-

nen dann Rückschlüsse auf die Größe (Forward Scatter, FCS), die Granularität (Side Scatter, SCC) und die Markierung der Zelle mit fluoreszierenden Farbstoffen gezogen werden. Das Argon-Laserlicht führt zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, welche wiederum bei der Rückkehr in ihren energetischen Grundzustand Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge emittieren, das durch empfindliche Photozellen detektiert wird.

Nach diesem Prinzip wurde nun die Aufnahme von Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) markierten VLPs in die Zellen untersucht. Dabei wird das gut zellgängige CFDA intrazellulär zu CFSE metabolisiert, das Licht von 488 nm auf einer Wellenlänge von 517 nm emittiert. Zur Messung der Rate an fluoreszierenden Zellen wurden die DCs in FACS-Röhrchen überführt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Nach Resuspension in 500 µl FACS Puffer wurden die Zellen vermessen.

6.2.2. Untersuchung der Präsentation von baculoviralen VLPs durch DCs

Färbung der baculoviralen VLPs und Untersuchung der Aufnahme durch DCs mittels FACS und Fluoreszenzmikroskopie

Der Versuch folgte in weiten Teilen dem unter 6.2.1. beschriebenen Ablauf. Gefärbt wurden diesmal jedoch die im Versuchsteil 6.1.3. isolierten 97CN001 und ZM96 Baculovirus-expressed Virus like particles (BV-VLPs) und IIIB BV-VLPs die freundlicherweise von Alexander Kliche zur Verfügung gestellt wurden. 50 µg der jeweiligen BV-VLPs wurden entsprechend dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll mit CFDA markiert. Wie auch in Versuch 6.2.1 wurden nach bekanntem Protokoll DCs erzeugt, die an Tag 5 mit den VLPs inkubiert wurden. Dabei wurden 25 µg gefärbte VLPs pro 500 000 Zellen eingesetzt. 8 h nach Beginn der Inkubation wurden die Aufnahme der VLPs in die Zellen mit Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie untersucht.

6.2.3. Untersuchung der Aufnahme von GFP-VLPs durch DCs

Testung des GFP Vektors von Genart

Das grün fluoreszierende Protein (engl. green fluorescent protein; Abkürzung GFP) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*. Regt man das Protein mit blauem oder ultraviolettem Licht an, fluoresziert es grün. Dabei besteht der Vorteil von GFP darin, dass es im Gegensatz zu vielen anderen fluoreszierenden Molekülen wie zum Beispiel FITC (kurz für Fluoresceinisothiocyanat) nicht zelltoxisch ist. Zudem kann es an andere Gene gekoppelt werden und so Aufschluss über deren Expression geben. Hier wurde die GFP-Gensequenz in einen pcDNA3.1 (*Invitrogen*, Leek NV (NL)) Vektor integriert, der sich durch hohe Expressionsraten der Konstrukte in Säugetierzellen auszeichnet. Zudem wurde GFP an eine HIV-Gag Sequenz gekoppelt. Das rekombinante Plasmid wurde von der Firma *Genart* zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit des Vektors in 293 T Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen zunächst in 6-Well bis zur Konfluenz kultiviert. Als Medium diente D-MEM mit einem Volumenanteil von 1% Penicillin/Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum. Für die Transfektion wurden zunächst 6 Ansätze erzeugt, wobei für jeden Ansatz 100 µl NaCl und 6 µl PEI auf den Grund eines Eppendorfcups vorgelegt wurden. Anschließend wurde in ein weiteres Cup 3 µg der Vektor-DNA gegeben und der Inhalt des ersten Cups in dieses Cup überführt. Es erfolgte eine Inkubation der Ansätze bei RT für 15 min..

Während dieser Zeit wurden die 293 T Zellen in D-MEM-Medium mit 10% FKS ohne Antibiotika überführt. Nach Zugabe der Transfektionsansätze erfolgte die Kultur im Brutschrank bei 37°C . Die Zellen wurden nach 24 h, 48 h und 96 h fluoreszenzmikroskopiert.

Produktion von GFP-VLPs unter Kontrolle mittels FACS

Im nächsten Schritt wurden gemischte VLPs erzeugt. Dabei wurden DNA-Vektoren für zwei verschiedene Gag- Isolate mit dem GFP-Gag Vektor kombiniert. Neun Anteile des IIIB-Gag-DNA-Vektors bzw. ZM-96-Gag-DNA-Vektors wurden dazu mit jeweils einem Anteil GFP-Gag Vektorplasmid inkubiert. Als Zellen dienten FreeStyle 293F Zellen von *Invitrogen*. Diese Zellen leiten sich von der HEK-293 Zelllinie (auch Human Embryonic Kidney- Zelllinie) ab, sind aber für eine Suspensionskultur ausgerichtet. Das Wachstum erfolgte in FreeStyle 293 Expressionsmedium (*Invitrogen*) bei 37°C unter leichtem Schütteln (100 rpm). Die Zellen wurden für die Transfektion zunächst in 12 Erlenmeyer Kolben mit jeweils 30 ml FreeStyle Medium ohne Antibiotika überführt und auf eine Zelldichte von 1 Mio. Zellen/ml eingestellt. Dann wurden die Transfektionsansätze für die einzelnen Kolben erzeugt.

Pro Ansatz wurden insgesamt 37 µg DNA verwendet. 6 Ansätze enthielten jeweils 33,3 µg IIIB-Gag-Vektor-DNA und 3,75 µg der GFP-Gag-Vektor-DNA. Die anderen 6 Ansätze enthielten 33,3 µl ZM96-Gag-Vektor-DNA und 3,7 µg GFP-Gag-Vektor-DNA. Alle Ansätze enthielten 1,35 ml DMEM und 900 µl PEI. Die Ansätze wurden für 10 min. bei RT inkubiert, dann wurden jeweils 1,5 ml der beiden Transfektionsansätze auf jeweils 6 Kolben verteilt. Die Kolben wurden anschließend für 5 h bei 37°C auf dem Schüttlinkubator inkubiert bevor die Zellen in Freestyle Medium mit 1% Penicillin Streptomycin überführt wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 Tage bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. An Tag 4 und 5 der Kultur wurden zwei beliebigen Kolben der drei verschiedenen Klone jeweils 2 ml der Zellsuspension entnommen. Die Zellen wurden pelletiert, in FACS-Puffer resuspendiert und dann in FACS Röhrchen überführt und vermessen.

Aufreinigung der VLPs und Quantifizierung mittels Coomassiefärbung

An Tag 4 und 5 nach der Transfektion wurden aus 2 Kolben der beiden verschiedenen Ansätze jeweils 2 ml entnommen und 10 min bei 300g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in FACS Puffer gelöst und dann mit dem Durchflusszytometer vermessen.

Nach 5 Tagen erfolgte die Aufreinigung der VLPs mittels UZ nach bereits beschriebenem Protokoll. Für die Quantifizierung wurden die Proben nach untenstehender Tabelle auf Gele aufgetragen und dann wie bereits beschrieben mittels Coomassie-Färbung mit der Auswertesoftware von *Cybernetics* quantifiziert.

BSA	5 µg	10 µg	20 µg	30 µg	40 µg	50µg
Boiling Mix	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

VLP-Proben	5µl	10µl	20µl
Boiling Mix	10µl	10µl	10µl

Analyse der VLP Aufnahme in DCs mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie

Die für die folgenden Versuche benötigten DCs wurden nach dem in 6.2.1 beschriebenen Protokoll isoliert und maturiert. Die Zellen wurden mit dem Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von 5×10^5 DC/ 500 µl DC-Medium in die Felder einer 24-Napfplatte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend 8 Stunden lang mit den VLPs inkubiert. Dann wurden sie unter dem Fluoreszenzmikroskop mit blauem Licht und mit dem Durchflusszytometer (FACS-Calibur; Firma *PharMingen* im FL1-Kanal (FITC-Kanal, 525 nm Wellenlänge) analysiert.

6.3. "In vitro Priming" von naiven T-Zellen durch murierte, gepulste DCs

6.3.1. Generierung von DCs

Die Isolation der DCs erfolgte zunächst wie zuvor beschrieben, wich aber in zwei Punkten vom obigen Protokoll ab. Zum einen wurden die Zellen nicht in DC-Medium sondern in serumfreiem Cell Gro Medium der Firma *Cellgenix* kultiviert, zum anderen wurden die Zellen unter dem Einfluss des sog. "Jonuleitcocktails" (IL-6 (Aktivität 1000 U/ml) , IL-1 β (Konzentration: 10 ng/ml) , TNF- α (Konzentration: 10 ng/ml) und PGE2 (Konzentration 1 μ g/ml) maturiert.

Dabei wurden die Zellen an Tag 5 nach der Isolation zunächst mit den entsprechenden Proteinen inkubiert. Nach 8h Inkubationszeit wurde dem Zellkulturmedium "Jonuleitcocktail" zugesetzt.

6.3.2. Generierung von humanen CD4⁺ T-Zellen mittels

Dichtestufengradientenzentrifugation und Magnetic Cell Sorting

Nach in 6.2.1. beschriebenem Protokoll wurden CD14⁺ Zellen aus jeweils 50 ml Blut dreier Spender isoliert. Die CD14⁺ Zellen wurden über MS-MACS Säulen gebunden, während die restlichen PBMCs sich im Überstand sammelten. Der Überstand wurde 10 min. lang bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 240 μ l MACS Puffer gelöst. Die Isolation der T-Zellen erfolgte über die sogenannte "No touch-Methode" der Firma *Miltenyi*. Alle Zellen bis auf die gewünschten Zellpopulation werden dabei über magnetische AK mit einer magnetischen Säulen konjugiert. Nur die Zellen der gewünschten Population durchlaufen die Säulen und sammeln sich im Überstand. Im ersten Schritt wurden der Zellsuspension 60 μ l des AK-Cocktails zugesetzt. Es erfolgte eine Inkubation im Kühlschrank für 10 min. Im zweiten Schritt wurden die gebun-

denen AK an magnetischen Micro Beads (*Miltenyi*) gekoppelt. Dafür wurden zunächst 120 µl Anti-Biotin Micro Beads zugegeben und die Proben dann gevortext. Die Proben wurden für 15 min. im Kühlschrank inkubiert. In dieser Zeit wurden LS Säulen von *Miltenyi* in den dafür vorgesehen Magneten eingelegt und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die Proben wurden aus dem Kühlschrank genommen, mit 9 ml Puffer P2 aufgefüllt und 10 min. lang bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Puffer P2 resuspendiert und auf die Säulen gegeben. Nach dreimaligem Nachspülen befanden sich die T-Zellen im Überstand, während die restlichen Zellen an die Säulen gebunden hatten. Nach einer Zählung erfolgte die Separation von CD25⁺ regulatorischen T-Zellen aus der Suspension mittels MACS. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 g, 10 min) wurden pro 10⁷ Zellen jeweils 80 µl Puffer und 20 µl CD25⁺-AK zugegeben. Die Proben wurden gevortext und für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf die zuvor kalibrierte MS-Säulen gegeben, wobei sich die CD25 freie Population der CD4⁺ Zellen im Überstand sammelte. Die Zellen aus dem Überstand wurden gezählt und dann zur Kultur auf 24-Napfplatten verbracht.

6.3.3. Kokultur von T-Zellen und DCs

Die T-Zellen wurden für 14 Tage mit gepulsten oder ungepulsten maturen DCs kokultiviert. Der Begriff "pulsen" beschreibt hierbei im Folgenden einen Vorgang, bei dem DCs für 8h mit Protein inkubiert werden. Bei der Kokultur betrug das Verhältnis von T-Zellen zu DCs 60:1. Die Kultur erfolgte in 96 Napf-U-Bodenplatten, als Medium dienten jeweils 200 µl serumfreies Cell Gro Medium, die Temperatur betrug 37°C . Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel wobei 100 µl Medium vom oberen Rand des Napfplattenfeldes abgesaugt und frisches Medium ersetzt wurden. Insgesamt zwei Mal innerhalb von 14 Tag wurden die T-Zellen in eine neue Kultur von DCs überführt. Dazu wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig vom Grund des Napfplattenfeldes gelöst. An Tag 15 der Kokultur wurden die T-Zellen erneut in eine frische Kultur DCs überführt. 2 h nach diesem Vorgang wurde den Zellen Brefeldin A in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Brefeldin A verhindert die Sekre-

tion von IFN- γ aus aktivierten T-Zellen. 5 Stunden darauf folgte die Ernte der Zellen und die FACS-Färbung des CD4 Rezeptors, CD154 Rezeptors und eine intrazelluläre Färbung von IFN- γ .

6.3.4. Intra- und extrazelluläre Färbung von T-Zellen und Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 2 Mal für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Dazwischen wurden die Überstände jeweils verworfen und die Röhrchen mit 2 ml FACS Puffer befüllt. Nach diesen Waschschritten wurden pro Röhrchen 5 μ l CD 16/32 AK (CD16/32- α -mouse: PharMingen #0141A) zugegeben, was der Blockierung der Fc-Rezeptoren auf den Zellen diente. Die Zellen wurden für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Oberflächenfärbung der Proben mit dem CD4 AK (AK CD4 V450 human; Pacific Blue; BD). Die Proben wurden nun für 15 min. bei RT inkubiert. Es folgten 2 Waschschrritte nach oben beschriebenen Prinzip, dann wurden die Proben jeweils mit 250 μ l Cytofix/Cytoperm Reagenz permeabilisiert und dazu 20 min. lang bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschrritte, dann wurden die Zellen intrazellulär gegen das Oberflächenmolekül CD154 (Anti human APC AK; BD) und IFN- γ -AK (PE Mouse Anti-Human INF; BD) gefärbt. Dazu wurden in jedes Röhrchen 10 μ l IFN- γ -AK und 20 μ l CD154 AK pipettiert. Alle Proben wurden gevortext und dann 15 min. lang bei RT inkubiert. Es erfolgten 2 Waschschrritte mit Perm Wasch, dabei wurden die Proben bei 500 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Vermessung der Proben mittels Durchflusszytometrie im FTL1-Kanal.

Teil III.

Ergebnisse

7. Ergebnisse

7.1. Herstellung von VLPs mit dem Bac-to-Bac System von Invitrogen

Als potentieller Impfstoffkandidat wurden VLPs verwendet, die zunächst in Insektenzellen produziert wurden. VLPs entstehen, wenn die gag-Gene in einer eukaryotischen Zelle exprimiert werden und das Gag-Vorläuferprotein Pr55^{gag} gebildet wird. Das unprozessierte Vorläuferprotein lagert sich an die Plasmamembran an und knospt aus der Wirtszelle aus. Dabei entstehen 100-120 nm große Partikel, die von Wirtszellmembran ummantelt sind. Für die Produktion von VLPs wurde das Bac-to-Bac Expressionssystem von *Invitrogen* verwendet. Es dient der Expression von rekombinanten Genen, in einem vom Baculovirus (kurz BV) abgeleiteten Bacmid. Mit dem Bacmid können Insektenzellen transfiziert werden, die dann rekombinante Baculoviren produzieren. Diese können genutzt werden, um Insektenzellen zu infizieren. Nach der Infektion stellen die Insektenzellen die auf dem Virus kodierten Fremdproteine her. Hier wurden VLPs aus den gag-Genen zweier HIV-Isolate produziert (97CN001 und ZM96). Da sie in Insektenzellen nach der Infektion mit Baculoviren produziert wurden, werden sie im Folgenden mit BV-VLPs abgekürzt.

Zunächst wurden die gag-Gensequenzen der HIV-Isolate ZM 96 und 97 CN001 mit Hilfe der Restriktionsenzyme Xho1 und KpnI in das pFastBac-Donorplasmid aus dem "Bac-to-Bac Kit" legiert. Jedes der rekombinanten Plasmide wurde in 12DH5 α E.coli Schüttelkulturen vermehrt. Anschließend wurden die Plasmide mit dem "Mini Präp Kit" der Firma *Quiagen* aufgereinigt. Aus den Plasmidproben jeder Bakterienkultur wurde ein Kontrollverdau mit Xho1 und Kpn1 angefertigt. Die DNA-Fragmente des Kontrollverdaus wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und zu einem DNA-Standard in Bezug gesetzt. Auf den Gelen zeigten sich die korrespondierenden Banden für die gag-Gensequenz und das Donorplasmid.

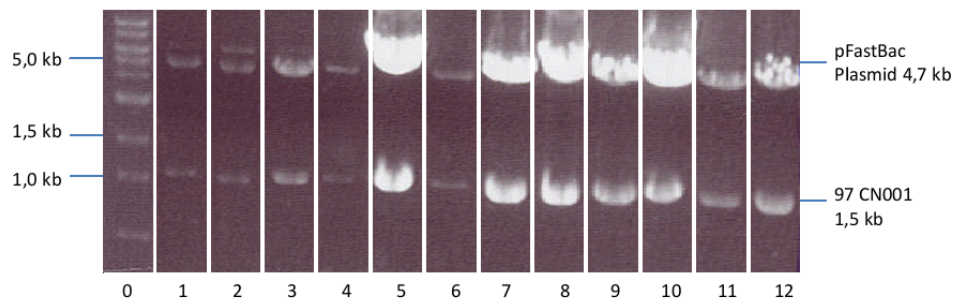


Abbildung 7.1.: Insertnachweis von 97CN001-Gag im pFastBac Donorplasmid.
 Spur 1: DNA-Längenstandard (1 kb, New England Biolabs)
 Spur 2-12: Kontrollverdau der Plasmid-DNA aus 12 Bakterienkolonien

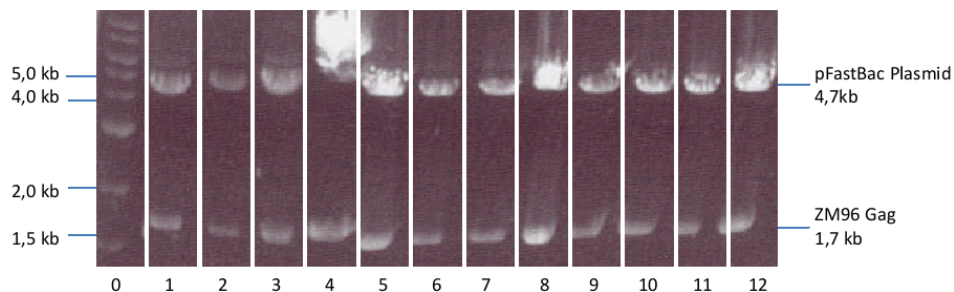


Abbildung 7.2.: Insertnachweis von ZM96-Gag im pFastBac Donorplasmid.
 Spur 1: DNA-Längenstandard (1 kb, New England Biolabs)
 Spur 2-12: Kontrollverdau der Plasmid-DNA aus 12 Bakterienkolonien

Es folgte die Transformation des Donorplasmides in das Bacmid der DH10 Bac Bakterien. Sie enthalten das Bacmid bMON14272 und das Helferplasmid bMON7124. Das Bacmid enthält eine mini-att Tn7-Targetstelle. Das mini-Tn7 Element auf dem Donorplasmid kann mit Hilfe von Transpositionsproteinen in diese Targetstelle eingebaut werden. Die Transpositionsproteine werden ihrerseits von einem im Bakterium enthaltenen Helferplasmid produziert. Das Bacmid enthält ein mini-F Replicon und kodiert für eine Kanamycinresistenz und das lacZ α Peptid. Dieses Peptid ist in der Lage, in Gegenwart von Blue-Gal oder X-Gal und dem Induktor IPTG (kurz für Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) blauen Farbstoff zu produzieren. Die Bacmid-tragenden Kolonien erscheinen blau.

In das N-terminale Ende der Sequenz, die für das lacZ α Peptid kodiert, ist die oben beschriebene Zielstelle für das Tn7 Element auf dem Donorplasmid eingebaut. Wird das Plasmid durch Transposition hier eingeschoben, kann die Sequenz für das Protein nicht mehr abgelesen werden und die Kolonien verlieren ihre Eigenschaft blauen Farbstoff zu produzieren und erscheinen weiß. Nach 48 h Kultur auf speziellen Luria Agar Platten die Kanamycin, Gentamycin, Tetracyclin, IPTG und X-Gal enthielten, wurden jeweils 8 weiße Kolonien jeden Klones ausgewählt und erneut auf den speziellen Luria-Agarplatten vermehrt. Anschließend wurden jeweils 12 Kolonien jeden Klones ausgewählt, in Flüssigmedium überführt und vermehrt.

Um die erfolgreiche Integration der Gensequenzen für ZM96-gag und 97CN001-gag in die Bacmid-DNA zu kontrollieren, wurde eine PCR durchgeführt. Gensequenzen werden innerhalb des Bacmids in die sog. Tn7 Zielsequenz eingebaut. Die Primer "M 13-21" und "M13 R" flankieren die Enden der Tn7 Zielsequenz, so dass ohne Insert ein PCR Produkt von 2300 bp entsteht. Bei gelungener Transposition von Gensequenzen des Donorplasmid in die Tn7 Zielsequenz, addiert sich zur Länge der Zielsequenz (2300 bp) die Länge des Inserts. Daraus ergab sich im Fall des 97CN001-gag-Gens eine erwartete Bande bei einer Sequenzlänge von 3817 bp (91CN001 gag: 1517 bp + Zielsequenz: 2300 bp) und im Fall von ZM96-gag-Gens bei 3881 bp (ZM96 gag: 1581 bp + Zielsequenz: 2300 bp).

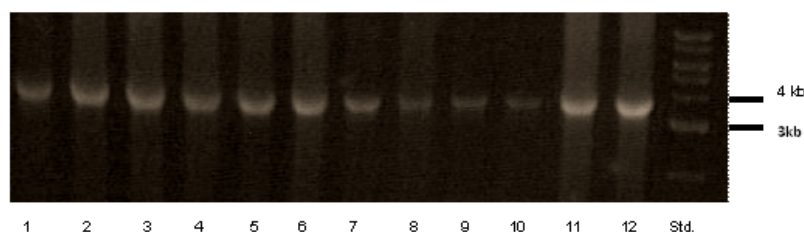


Abbildung 7.3.: PCR Produkt von Proben der 12 aufgereinigten Bacmid Klone Spur Std.: DNA-Längenstandard (1 kb, New England Biolabs) Spur 1-12: PCR-Produkt des 97 CN001 Gag Gens nach Insertion in das Bacmid der DH 10 Bac Bakterien, erwartete Bande bei 3817 bp

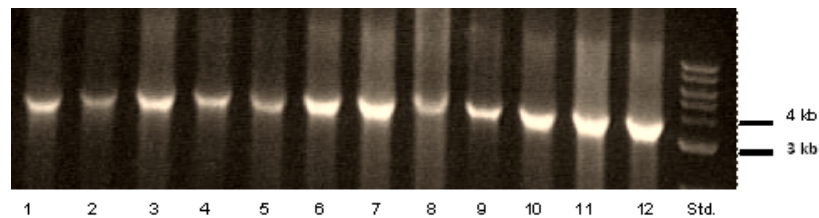


Abbildung 7.4.: PCR Produkt von Proben der 12 aufgereinigten Bacmid Klone Spur Std.: DNA-Längenstandard (1 kb, New England Biolabs) Spur 1-12: PCR-Produkt des ZM96 Gag Gens nach Insertion in das Bacmid der DH 10 Bac Bakterien, erwartete Bande bei 3881 bp

Nachdem in der PCR der Erfolg der Transformation bestätigt werden konnte, wurden Sf9 Zellen mit der Bacmid-DNA transfiziert. Dazu wurden aus den Bacmidproben die Klone 97CN001 1,2,4,5,7,8 und die ZM96 Klone 1,2,3,6,7,9 ausgewählt. 72 h nach der Transfektion konnten die Baculoviren aus den Überständen geerntet werden. Der Nachweis der Viren erfolgte mittels Western Blot. Dabei wurde das für Baculoviren spezifische Antigen gp 64 nachgewiesen. Dieses wird in der frühen (0-6h) und der späten (6-24h) Phase der Infektion gebildet und spielt in der unbehüllten Form des BV eine wichtige Rolle bei der AusknoSPung aus der Zelle und der Infektion neuer Zellen. Gp 64 wurde nach seinem Molekulargewicht von 64 kDa benannt.

Abbildung 7.5 und 7.6 zeigen eine Bande bei 64 kDa, die das Antigen gp 64 repräsentiert. Somit konnte die Entstehung von Baculoviren in den Sf9 Zellen nachgewiesen werden. Die korrekte Position der Zielensequenzen innerhalb der Baculovirus-DNA wurde durch eine von der Firma *Genart* durchgeführte Sequenzierung bestätigt.

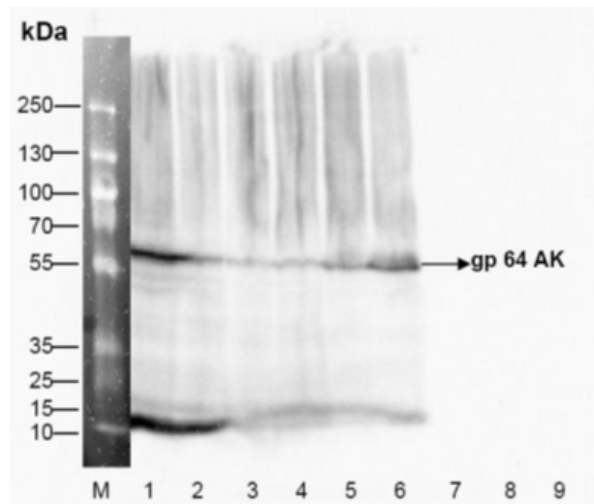


Abbildung 7.5.: Western Blot zum Nachweis von gp 64 auf der Oberfläche von 6 ausgewählten Klonen des rekombinanten Baculovirus mit der integrierten Gensequenz des gag-Gens aus dem HIV-Isolat ZM96 Spur M.: Page Ruler Plus Ladder Standard Spur 1-6: Baculovirusklone 1,2,4,5,7,8 Spur 7-9 Negativkontrollen

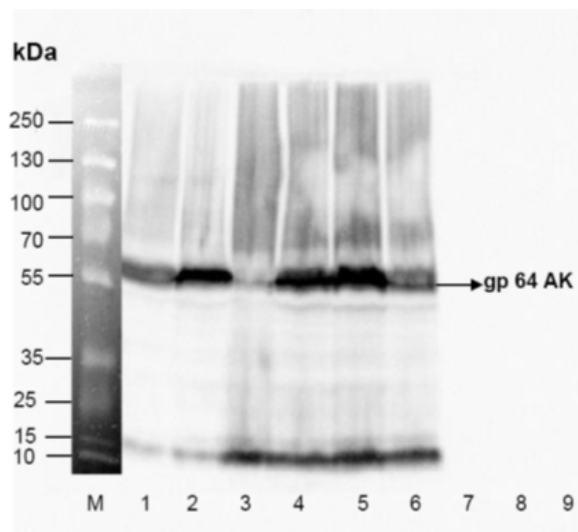


Abbildung 7.6.: Western Blot zum Nachweis von gp 64 auf der Oberfläche von 6 ausgewählten Klonen des rekombinanten Baculovirus mit der integrierten Gensequenz des gag-Gens aus dem HIV-Isolat 97 CN001 Spur M.: Page Ruler Plus Ladder Standard Spur 1-6: Baculovirusklone 1,2,3,6,7,9 Spur 7-9 Negativkontrollen

7.2. Experiment zur Aufnahme von M-VLPs in DCs

In diesem Experiment wurde die Aufnahme von in Säugetierzellen produzierten VLPs (kurz M-VLPs) in DCs untersucht. Dazu wurden die VLPs mit CFDA-SE markiert. Erst wenn das nicht fluoreszierende CFDA-SE in das Zytoplasma von Zellen gelangt, entsteht das fluoreszierende CFSE, dass mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt werden kann. Die Fluoreszenz in den DCs ist damit Indikator für die Aufnahme CFDA-SE markierter VLPs. Zudem wurde ein Experiment durchgeführt, mit welchem der Einfluss einer Lagerung bei - 20°C auf CFDA markierte VLPs untersucht wurde. Dazu wurden VLPs erzeugt, bei -20°C gelagert und wieder aufgetaut. DCs zweier Spender wurden in zwei verschiedenen Napfplatten mit äquivalenten Mengen aufgetauter und frisch hergestellter VLPs inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz in den DCs mittels Durchflusszytometrie gemessen und der Prozentsatz an fluoreszierenden DCs verglichen.

In Vorbereitung auf den Versuch wurden zunächst M-VLPs in 293T-Zellen hergestellt. Dazu wurden diese mit einem Plasmidvektor transfiziert, der für die gag-Gensequenzen unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kodierte. Die Zellen wurden mit dem ZM96-gag-Vektor und dem 97 CN001-gag-Vektor transfiziert und anschließend für 5 Tage kultiviert. Die Aufreinigung der VLPs erfolgte mittels UZ wie in Abschnitt 6.1.3 beschrieben, dann wurden die VLPs mittels Coomassie Gel nachgewiesen und quantifiziert. Für die 97 CN001 Gag VLPs wurde eine Konzentration von 0,4 µg/µl, für die ZM96 VLPs eine Konzentration von 0,34 µg/µl ermittelt. (Abbildung 7.7 und 7.8)

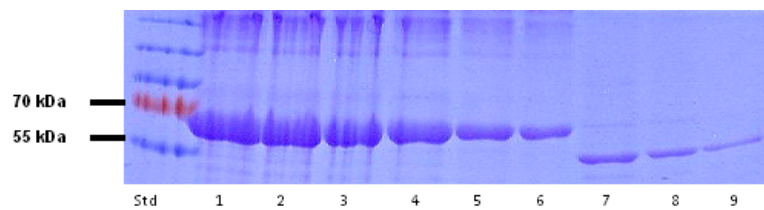


Abbildung 7.7.: 12 %-iges Coomassie Gel zum Nachweis und zur Quantifizierung von CFDA-SE markierten M-VLPs, produziert mit dem gag-Gen des Isolats 97CN001. Erwartete Bande für die VLPs bei 55 kDa

Spur Std.:Standard

Spur 1: BSA 50 µg

Spur 2: BSA 40 µg

Spur 3: BSA 30 µg

Spur 4: BSA 20 µg

Spur 5: BSA 10 µg

Spur 6: BSA 5 µg

Spur 7: M-VLPs 2 µl

Spur 8: M-VLPs 5 µl

Spur 9: M-VLPs 10 µl

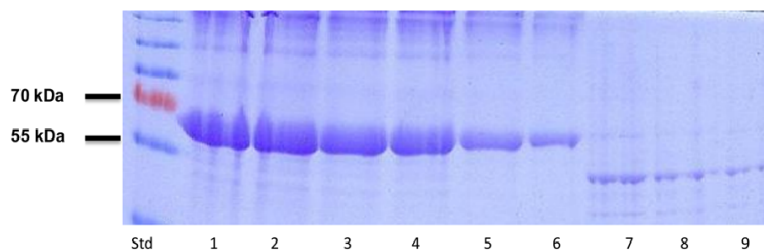


Abbildung 7.8.: 12 %-iges Coomassie Gel zum Nachweis und zur Quantifizierung von CFDA-SE markierten M-VLPs, produziert mit dem gag-Gen des Isolats ZM96. Erwartete Bande für die VLPs bei 55 kDa

Spur Std.:Standard

Spur 1: BSA 50 µg

Spur 2: BSA 40 µg

Spur 3: BSA 30 µg

Spur 4: BSA 20 µg

Spur 5: BSA 10 µg

Spur 6: BSA 5 µg

Spur 7: M-VLPs 2 µl

Spur 8: M-VLPs 5 µl

Spur 9: M-VLPs 10 µl

Der Versuch zur Aufnahme der CFDA markierten VLPs in DCs gliederte sich in 5 Versuchstage. Abb. 7.9 gibt einen Überblick über die Abläufe.

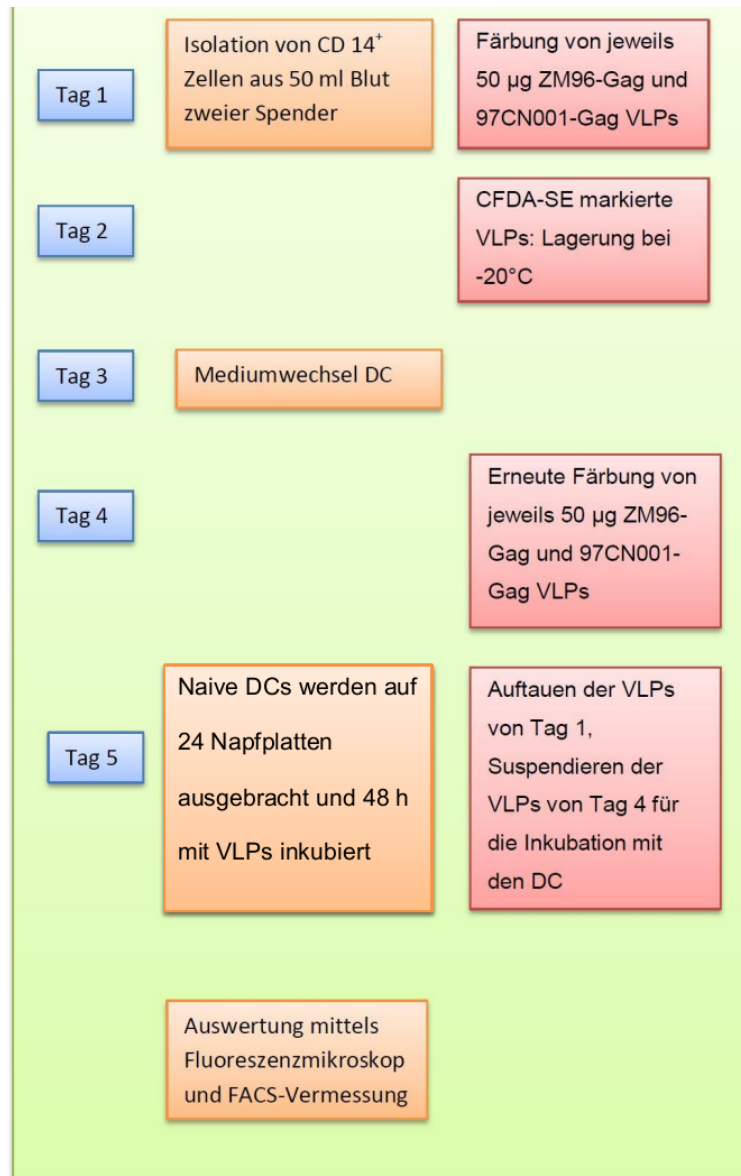


Abbildung 7.9.: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Experiments zur Aufnahme von M-VLPs in DCs

An Tag 1 wurden CD14⁺ Zellen aus 50 ml Spenderblut des Spenders Nr.1 und Spenders Nr.2 gewonnen. Die Zellen wurden zur Ausdifferenzierung in Medium mit GM-CSF und IL-4 aufgenommen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am selben Tag wurden 50 µg ZM96-Gag VLPs und 50 µg 97CN001 VLPs mit CFDA gefärbt. Als Negativkontrolle dienten jeweils 50 µg BSA. Die VLPs wurden über Nacht auf Eis

gelagert. An Tag 2 wurden sie in Eppendorf Cups überführt und bei -20°C eingefroren (Bezeichnung: VLPs₋₂₀). An Tag 3 erfolgte der Mediumwechsel in der Kultur der DCs. An Tag 4 wurden erneut jeweils 50 µg ZM96 und 97CN001 und BSA gefärbt und über Nacht im Kühlschrank gelagert (Bezeichnung: VLPs₊₅). An Tag 5 wurden die ausdifferenzierten DCs der beiden Spender in einer Dichte von 500 000 Zellen pro Napfplattenfeld auf jeweils 8 Felder einer 24 Napfplatte aufgebracht. Dann wurden nach dem folgenden Schema VLPs₋₂₀ Proben, VLPs₊₅ Proben und BPS-Proben zu den DCs pipettiert (Abb.7.10). Es erfolgte eine Inkubation für 8 Stunden.

Napfplattenfeld	Auf DC aufgebrachte Proben
1	25 µg 97CN001-Gag VLPs ⁺⁵
2	25 µg ZM96-Gag VLPs ⁺⁵
3	25 µg BSA
4	25 µg BSA
5	25 µg 97CN001-Gag VLPs ₋₂₀
6	25 µg ZM96-Gag VLPs ₋₂₀
7	25 µg BSA
8	PBS

Abbildung 7.10.: Schema, nach dem DCs mit CFDA-markierten M-VLPs inkubiert wurden

Nach 8h Inkubation wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Für Spender 1 zeigte sich bei 10-facher Vergrößerung eine Fluoreszenz in den Napfplattenfeldern 1,2,3,5 und 6. Diese galt im Besonderen für jene DCs, die mit 97CN001-Gag VLPs₊₅ (Napfplattenfeld Nr.1) oder mit ZM96-Gag VLPs₋₂₀ (Napfplattenfeld Nr.6) inkubiert worden waren. Für Spender 2 zeigten sich fluoreszierende DCs in den Napfplattenfeldern 1,2,5 und 6. Besonders viele Zellen fluoreszierten in Feld Nr. 2, was einer Inkubation von DCs mit 97CN001-Gag VLPs₊₅ entsprach.

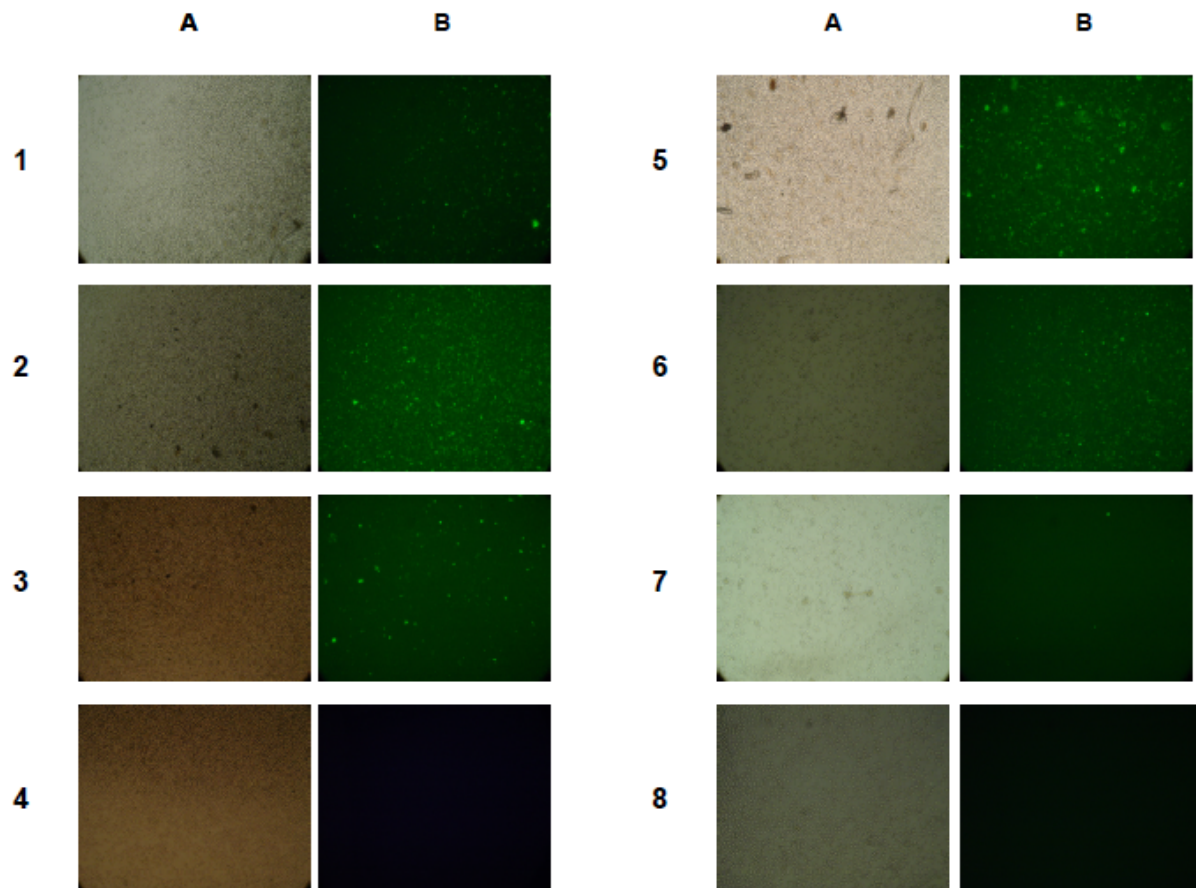


Abbildung 7.11.: Spender 1: Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DCs nach 8h Inkubation mit M-VLPs bei 10-facher Vergrößerung
 5×10^5 Zellen pro Napfplattenfeld
 A: Lichtmikroskopische Aufnahmen
 B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen
 (1) ZM96-Gag VLPs₊₅ (2) 97CN001-Gag VLPs₊₅ (3) Leerprobe mit PBS
 (4) Negativkontrolle BSA (5) ZM96-Gag VLPs₋₂₀ (6) 97 CN001-Gag VLPs₋₂₀ (7) Leerprobe mit PBS (8) Negativkontrolle BSA

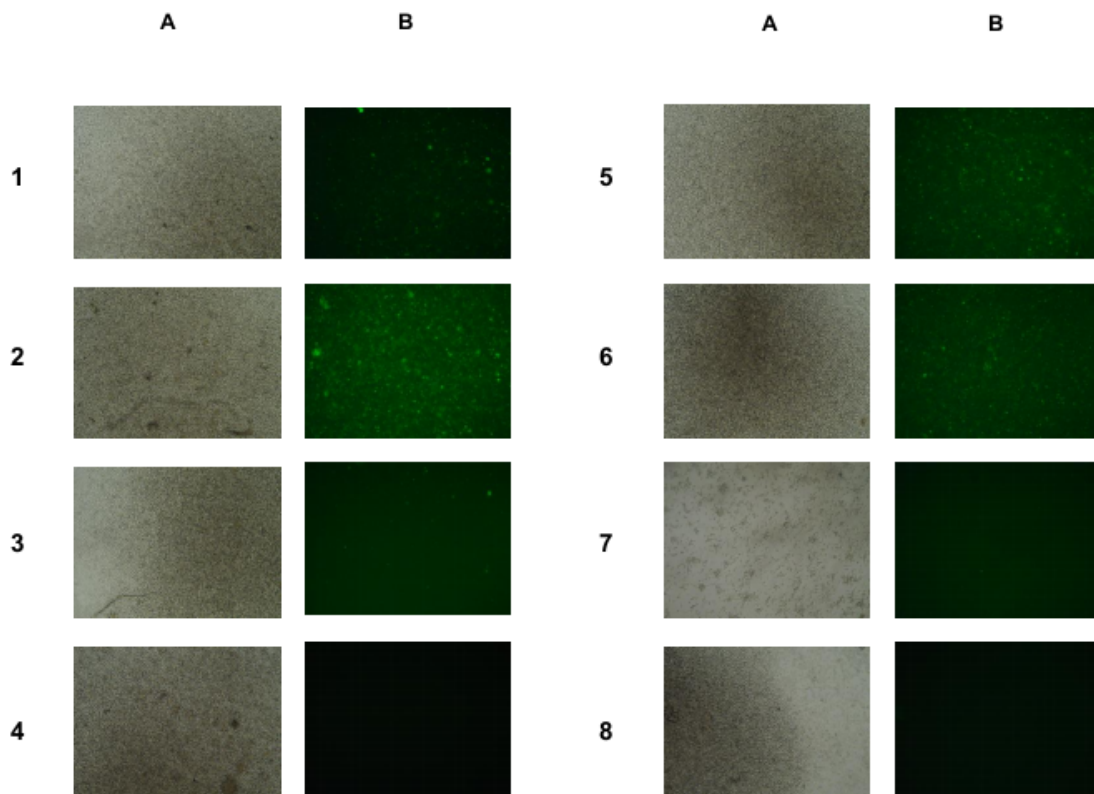


Abbildung 7.12.: Spender 2: Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DCs nach 8h Inkubation mit M-VLPs bei 10-facher Vergrößerung 5×10^5 Zellen pro Napfplattenfeld
A: Lichtmikroskopische Aufnahmen
B: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen
(1) ZM96-Gag VLPs₊₅ (2) 97CN001-Gag VLPs₊₅ 3) Leerprobe mit PBS
(4) Negativkontrolle BSA (5) ZM96-Gag VLPs₋₂₀ (6) 97 CN001-Gag VLPs₋₂₀ (7) Leerprobe mit PBS (8) Negativkontrolle BSA

Um die Fluoreszenz genauer zu bestimmen und zu objektivieren wurde eine Durchflusszytometrie der Zellen im FL1 Kanal (FITC-Kanal, 525 nm Wellenlänge) durchgeführt.

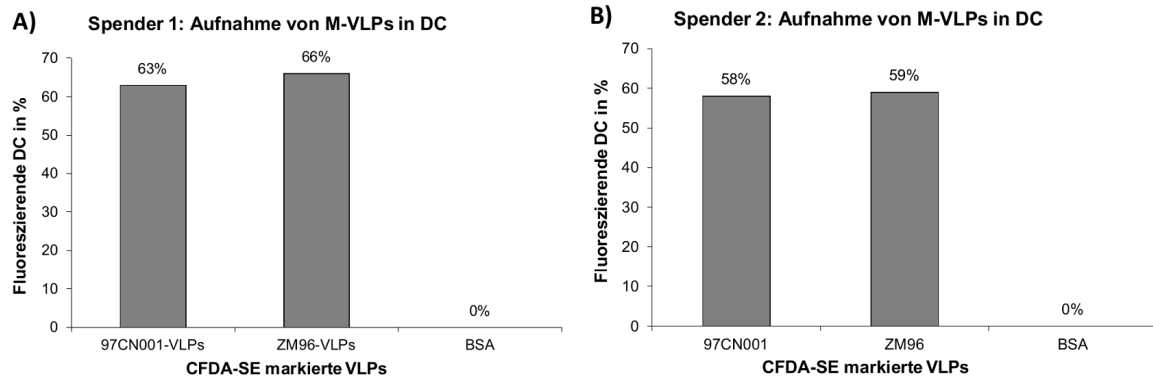


Abbildung 7.13.: Säulendiagramm des mittels Durchflusszytometrie gemessenen Prozentsatzes an fluoreszierenden DCs nach einer 8-stündigen Inkubation mit 25 µg CFDA-markierten VLPs oder 25 µg BSA (Negativkontrollen). Vermessen wurden jeweils 10 000 Zellen im FL1 Kanal. A) Spender 1, B) Spender 2

Für Spender 1 fluoreszierten nach 8 Stunden Inkubationszeit über 63 % der DCs die mit 97CN001-Gag-VLPs₊₅ inkubiert worden waren und 66% der Zellen die mit ZM96 -VLPs₊₅ inkubiert worden waren. In der Negativkontrolle zeigte sich keine Fluoreszenz. Für Spender 2 fluoreszierten nach gleicher Inkubationszeit 58% der DCs die mit 97CN001-Gag-VLPs₊₅ inkubiert worden waren und 59% der Zellen die mit ZM96 -VLPs₊₅ inkubiert worden waren.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss der Prozess des Einfrierens, die Lagerung bei -20°C und das Auftauen auf die Fluoreszenz von CFDA markierten VLP in DCs hat, wurden Zellen beider Spender mit jeweils 25 µg VLPs₋₂₀ für 8h inkubiert. Dann wurden die fluoreszierenden Zellen mit dem Durchflusszytometer quantifiziert. Die Rate an fluoreszierenden DCs nach Inkubation mit VLPs₋₂₀ wurde mit der von DCs nach Inkubation mit VLPs₊₅ verglichen.

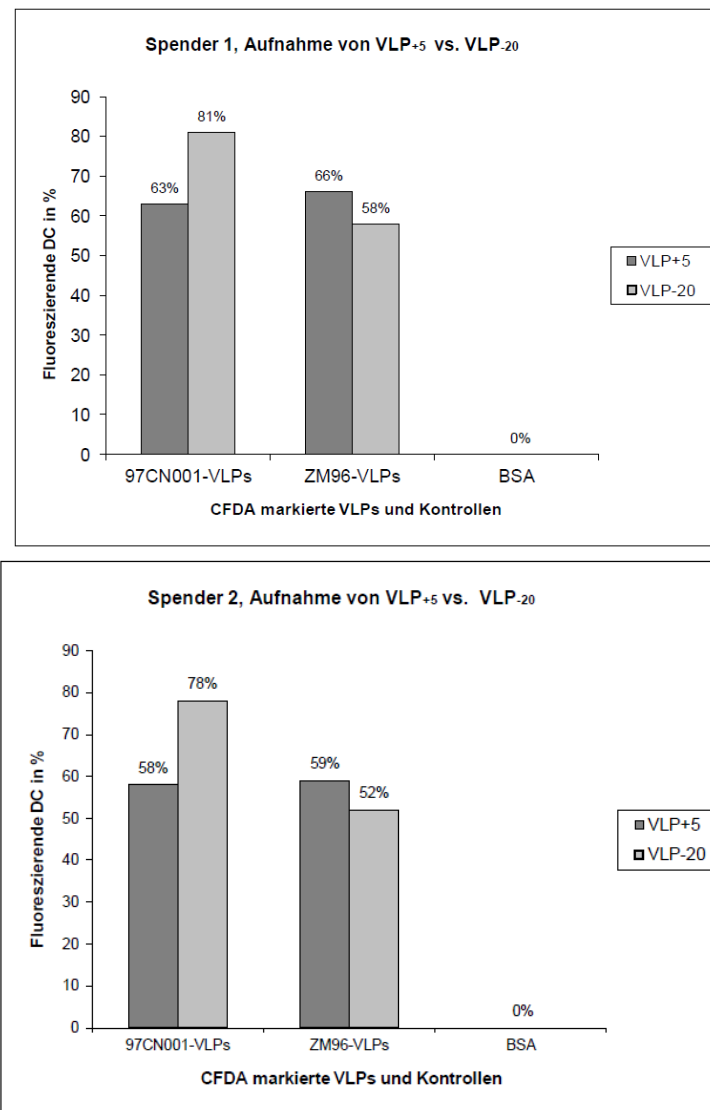


Abbildung 7.14.: Säulendiagramm des mittels Durchflusszytometrie gemessenen Prozentsatzes an fluoreszierenden DCs nach einer 8-stündigen Inkubation mit 25 µg CFDA-markierten VLPs₋₂₀ oder VLPs₊₅ im Vergleich. 25 µg BSA dienten jeweils als Negativkontrolle. Vermessen wurden jeweils 10 000 Zellen im FL1 Kanal. Oben Spender 1, Unten Spender 2

Für Spender 1 lag der Prozentsatz an fluoreszierenden Zellen für die mit 97 CN001-Gag VLPs₋₂₀ inkubierten DCs um 18% höher, als für die bei + 5 °C gelagerten VLPs aus dem gag-Gen des gleichen Isolates. Nach einer Inkubation mit ZM96-VLPs fluoreszierten 8% mehr DCs in der Probe die mit VLPs₅₊ inkubiert worden war, als in der Probe die mit VLPs₋₂₀ inkubiert worden war. In Spender 2 lag der Prozentsatz an fluoreszierenden Zellen für die Inkubation mit 97 CN001-Gag VLPs₋₂₀ 20% höher, als

für die Inkubation mit VLPs₊₅. Nach einer Inkubation mit ZM96-VLPs fluoreszierten in diesem Spender 7% mehr DCs in der Probe, die mit VLPs₊₅ inkubiert worden war, als in der Probe die mit VLPs₋₂₀ inkubiert worden war. In beiden Spendern lag also die Aufnahmerate für 97 CN001-Gag VLPs₋₂₀ höher, als für 97 CN001-Gag VLPs₊₅. Für ZM96 war die Aufnahmerate hingegen in beiden Spendern für jene Zellen höher, die mit den bei -20°C gelagerten VLPs inkubiert worden waren.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die M-VLPs aus den gag-Genen der getesteten Virusisolate erfolgreich mit CFDA markiert werden konnten. Dadurch wurde es möglich die Aufnahme der VLPs in die DCs durchflusszytometrisch zu quantifizieren. Es zeigte sich für beide Spender und die VLPs aus zwei verschiedenen HIV Isolaten nach 8 h Inkubation eine Fluoreszenz in mehr als 50% der Zellen. Die relativen Unterschiede in der Anzahl der fluoreszierenden Zellen waren für beide Spender nahezu identisch. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass CFDA-markierte VLPs der verschiedenen Chargen in beiden Spendern jeweils relativ zueinander gleich gut aufgenommen werden konnten. Die Fluoreszenz variierte dabei innerhalb der Chargen, schien jedoch unabhängig von der Lagerung der VLPs zu sein.

7.3. Experiment zur Aufnahme von CFDA markierten BV-VLPs und M-VLPs in DCs

In diesem Versuch wurde die Aufnahme von BV-VLPs in DCs untersucht. Zudem wurde die Aufnahme von M-VLPs mit der Aufnahme von BV-VLPs verglichen. Dabei bestand die Erwartung, dass die Insektenzellbestandteile in der Hülle der BV-VLPs sich wie ein Adjuvants auswirken und somit die Aufnahme der BV-VLPs im Vergleich zur Aufnahme von M-VLPs verstärken würde. Für den Versuch wurden DCs aus 50 ml Blut generiert (Spender 3 + 4). An Tag 4 der DCs Kultur wurden 25 µg VLPs pro Spender gefärbt. Verwendet wurden BV-VLPs der HIV-1 Isolate ZM96 und 97 CN001. Als Negativkontrolle dienten BSA und PBS. Nach der Färbung wurde überschüssiges CFDA durch UZ von den VLPs getrennt. Die VLPs wurden über Nacht mit PBS im

Kühlschrank inkubiert und am nächsten Tag resuspendiert. An Tag 5 wurden die matten DCs zunächst gezählt und dann in einer Menge von 500 000 Zellen Pro 24 Napfplattenfeld in 500 µl DC-Medium ausgesät. Die VLPs und die Negativkontrollen wurden nach folgendem Schema zu den DCs gegeben.

Lochplattenfeld	Auf DC aufgebrachte Proben
1	97CN001-Gag VLPs
2	ZM96-Gag VLPs
3	BSA
4	PBS

Abbildung 7.15.: Schema, zur Inkubation von DCs mit BV-VLPs

Nach 8 Stunden Inkubation wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

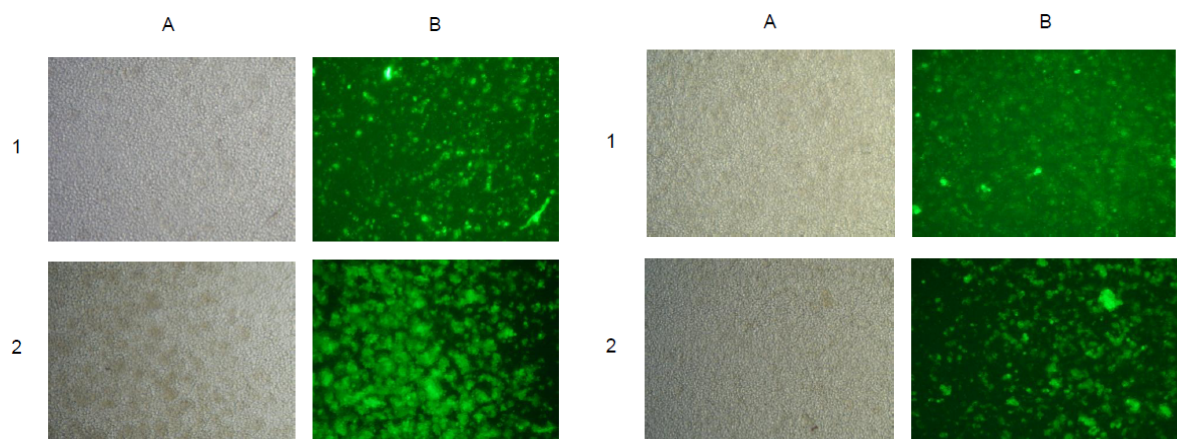


Abbildung 7.16.: Mikroskopische Aufnahmen von DCs des Spenders 3 (links) und des Spenders 4 (rechts) bei 10-facher Vergrößerung
A) Lichtmikroskopische Aufnahmen
B) Fluoreszenzmikroskope Aufnahmen
1) DCs nach 8 h Inkubation mit BV-VLPs des HIV-Isolat 97CN001
2) DCs nach 8 h Inkubation mit BV-VLPs des HIV-Isoalt ZM96

Für beide Spender zeigten sich in jenen Napfplattenfeldern mehr fluoreszierende Zellen, die mit ZM96-Gag-VLPs inkubiert worden waren. In den Negativkontrollen zeigten sich keine fluoreszierende Zellen, weshalb die Proben in Abb. 7.16 nicht

abgebildet wurden. Um die Beobachtungen zu objektivieren, wurden die Proben mit dem Durchflusszytometer vermessen. Für Spender 3 lag der Prozentsatz für die VLPs aus dem ZM96-gag-Gen 16 % höher als für die VLPs aus dem 97CN001-gag-Gen. Für Spender 4 lag die Fluoreszenz im Fall der ZM96-Gag-VLPs 33 % höher. Für beide Spender war der Anteil an fluoreszierenden DCs in den Negativkontrollen mit BSA nur knapp über 0 %.

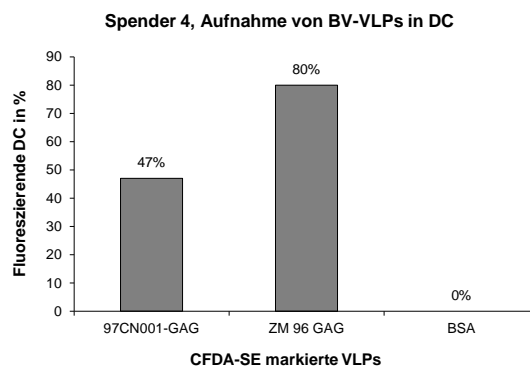
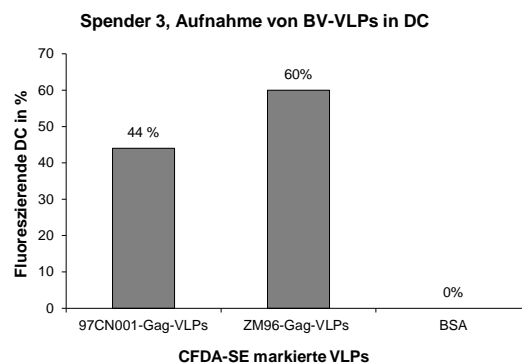


Abbildung 7.17.: Säulendiagramm zur grafischen Darstellung des bei der Durchflusszytometrie ermittelten Prozentsatz an fluoreszierenden DCs der Spender 3 (links) und Spender 4 (rechts). Die Zellen wurden für 8 h mit CFDA markierten BV-VLPs inkubiert. Vermessen wurden 10 000 Zellen im FT1 Kanal

Die hier ermittelten Fluoreszenzraten wurden mit den Fluoreszenzraten jener DCs verglichen, die mit M-VLPs inkubiert worden waren.

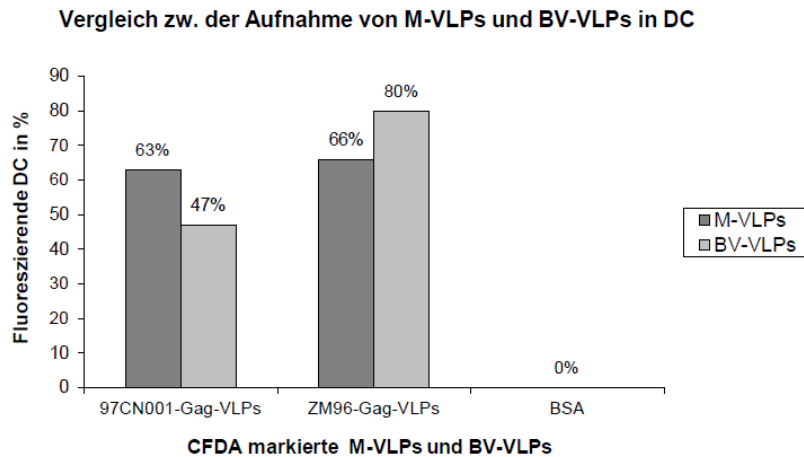


Abbildung 7.18.: Vergleich zwischen der Aufnahmerate von CFDA-SE markierten BV- und M-VLPs gleicher Virusisolate. Graphische Aufarbeitung der ermittelten Prozentsätze an fluoreszierenden Zellen im Säulendiagramm.

Für jene Zellen, die mit dem HIV-Gag des Virusisolates 97 CN001 inkubiert worden waren, lag die Rate an fluoreszierenden DCs im Fall der M-VLPs um 16% über der Rate, die für die BV-VLPs des gleichen Isolates gemessen werden konnte. Im Fall von VLPs aus dem Gag-Gen des Isolates ZM96 verhielt sich die Aufnahme invers. Hier hatten in jenem Napfplattenfeld in dem die Zellen mit BV-VLPs inkubiert worden waren, 14% mehr DCs fluoresziert, als im Vergleichsnapfplattenfeld in dem die Inkubation mit M-VLPs erfolgte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich auch BV-VLPs erfolgreich mit CFDA markieren lassen. Die Aufnahmerate lag in beiden Spendern für die ZM96-VLPs höher, als für die 97CN001-VLPs, in jedem Fall jedoch nach 8h über 44%. Für den Vergleich zwischen der Aufnahme von BV-VLPs und M-VLPs ergab sich ein uneinheitliches Bild. Dabei wurden M-VLPs aus dem Isolat 97CN001 stärker in DCs aufgenommen, als BV-VLPs des gleichen Isolates. Hingegen war die Aufnahmerate für BV-VLPs aus dem gag-Gen des HIV Isolates ZM96 höher, als die Aufnahmerate für die M-VLPs aus dem gag-Gen des gleichen Isolates. Diese Beobachtung deutet

darauf hin, dass es keinen entscheidenden Einfluss für die Aufnahme in DCs hat, ob die VLPs in Säugetierzellen oder in Insektenzellen produziert werden .

7.4. Experiment zur Produktion von GFP-Gag VLPs und Untersuchung der Aufnahme in DCs

Ziel des Experiments war es, die Aufnahme von GFP markierten VLPs in DCs zu untersuchen und die Methode mit der CFDA-SE-Färbung zu vergleichen. Das grün fluoreszierende Protein (Abkürzung GFP; engl. green fluorescent protein) stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*. Regt man das Protein mit blauem oder ultraviolettem Licht an, fluoresziert es grün. Dabei besteht der Vorteil von GFP darin, dass es im Gegensatz zu vielen anderen fluoreszierenden Molekülen wie zum Beispiel FITC nicht zelltoxisch ist. Zudem kann es an andere Gene gekoppelt werden und so Aufschluss über deren Expression geben.

Die in diesem Versuch verwendeten GFP-Gag-Donorplasmide wurden von der Firma *Genarts* zur Verfügung gestellt. Diese enthielten Gensequenzen in denen IIIB-gag und ZM96-gag an GFP-Gensequenzen gekoppelt vorlagen. Die DNA wurde in Vorbereitung auf den Versuch in 293F-Zellen vermehrt und mittels "Midi Präp Kit" der Firma *Invitrogen* aufgereinigt. Dann wurde die DNA in konfluenten 293T-Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen mit den Klonen 7 und 11 der IIIB-GFP-gag DNA und den Klonen 1 und 2 der ZM96-GFP-gag DNA transfiziert. Reine GFP-DNA diente als Positivkontrolle, PBS diente als Negativkontrolle. Abbildung 7.19 gibt ein Überblick über das Transfektionsschema. Die Zellen wurden am Tag 1, 2 und 4 nach der Transfektion fluoreszenzmikroskopiert. An Tag 1 zeigten sich unter dem Mikroskop noch keine fluoreszierenden Zellen. An Tag 2 und 4 zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz der Zellen. Die Negativkontrolle fluoreszierte nicht und wird deshalb nicht mit abgebildet.

Napfplattenfeld	Auf 293-F Zellen aufgebrachte DNA
1	GFP-DNA
2	PBS
3	III-B-GFP-GAG DNA: Klon 7
4	III-B-GFP-GAG DNA: Klon 11
6	ZM 96 GFP-GAG DNA: Klon 1
7	ZM 96 GFP-GAG DNA: Klon 2

Abbildung 7.19.: Schema zur Transfektion von 293F-Zellen mit dem rekombinanten Gag-GFP Vektor

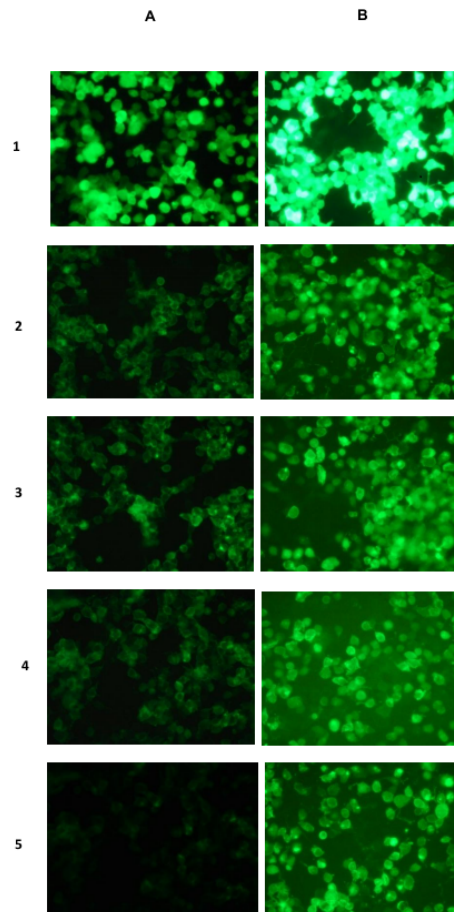


Abbildung 7.20.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293F-Zellen an Tag 2 bzw. 4 nach der Transfektion mit verschiedenen GFP-gag-Vektoren. Vergrößerung: 20-fach

- (A) Zellen an Tag 2 nach Transfektion
- (B) Zellen an Tag 4 nach Transfektion
- (1) Zellen nach Transfektion mit GFP-DNA
- (2) Zellen nach Transfektion mit IIIB-GFP-gag DNA Klon 1/7
- (3) Zellen nach Transfektion mit IIIB-GFP-gag DNA Klon 1/11
- (4) Zellen nach Transfektion mit ZM96-GFP-gag DNA Klon 2/1
- (5) Zellen nach Transfektion mit ZM96-GFP-gag DNA Klon 2/2

Nachdem der Beweis für die Funktionalität der Vektoren erbracht worden war, wurden VLPs in 293F-Zellen produziert. Dazu wurden zunächst 12 Kolben 293F-Zellen in 30 ml DMEM Medium ohne Antibiotika auf eine Zelldichte von 1 Mio Zellen pro Milliliter eingestellt. Dann wurden die Zellen transfiziert. Für die Transfektionsansätze wurde die GFP-DNA nicht pur eingesetzt. Die Ansätze für IIIB-Gag-VLPs und ZM96-Gag-VLPs enthielten 10 Anteile eines Gag-Donorplasmides und einen Anteil des GFP-Gag Donorplasmid. Parallel zu der Generierung der VLPs wurden CD14⁺ Zellen aus jeweils 50 ml Blut der Spender 4 und 5 gewonnen, die dann nach bekanntem Protokoll maturiert wurden. An Tag 4 und 5 nach der Transfektion der 293F-Zellen wurden 2 ml der Zellsuspension aus jeweils einem beliebigen Kolben der beiden verschiedenen Kulturen entnommen. Die Zellen wurden 10 min bei 300g zentrifugiert und dann in FACS Puffer resuspendiert. Die Zellen die an Tag 4 gewonnen wurden wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert. An Tag 5 wurden dann alle Proben mit dem Durchflusszytometer vermessen. Aufgenommen wurden 100 000 Zellen pro Probe.

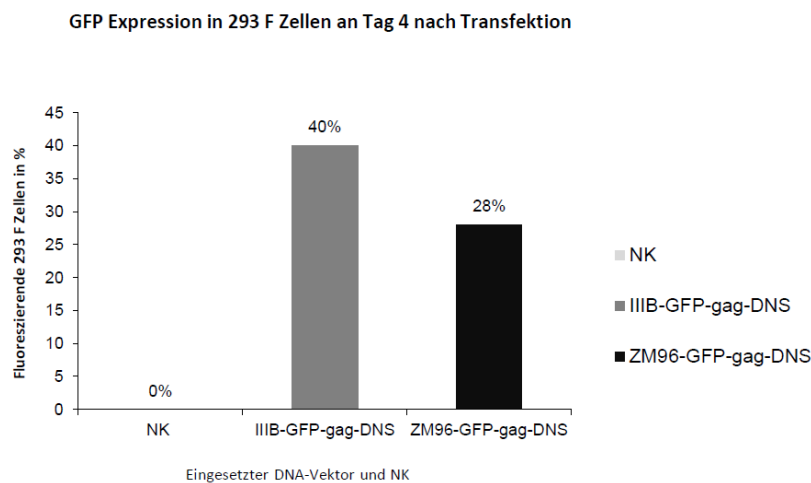


Abbildung 7.21.: Säulendiagramm der in der Durchflusszytomtrie ermittelten Prozentsätze an fluoreszierenden 293F-Zellen in Bezug zu der für die Transfektion verwendete DNA. Vermessen wurden 100 000 Zellen an Tag 4 nach der Transfektion

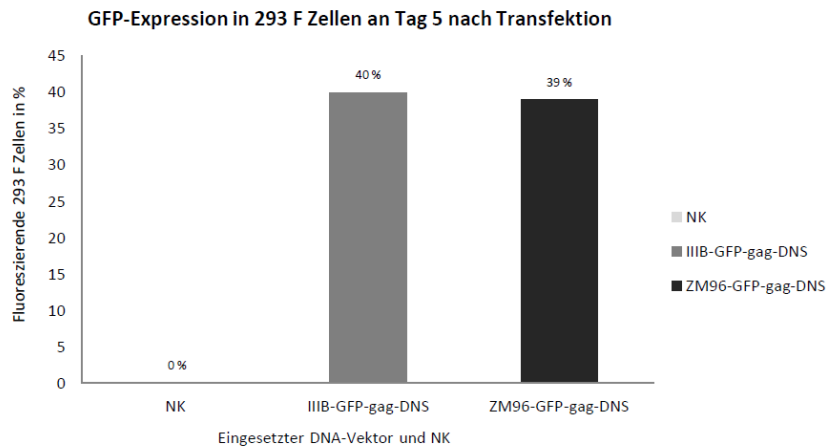


Abbildung 7.22.: Säulendiagramm der in der Durchflusszytometrie ermittelten Prozentsätze an fluoreszierenden 293F-Zellen in Bezug zu der für die Transfektion verwendete DNA. Vermessen wurden 100 000 Zellen an Tag 5 nach der Transfektion

In den Proben zeigte sich, dass der eingebracht GFP-DNA Vektor an Tag 5 in 39% bzw. 40% der 293F-Zellen exprimiert werden konnte. Zudem konnte ermittelt werden, dass die Expression des Vektors in den mit ZM96-Gag-DNA transfizierten Zellen innerhalb von 24 h um 10% zunahm. Nachdem der Erfolg der Transfektion mit der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte, wurden die 293F-Zellen jedes Kolbens in Reagenzgefäße überführt und bei 4000 g für 15 min zentrifugiert. Die Zellen selbst wurden verworfen, aus den Überständen wurden die VLPs mittels UZ aufgereinigt (s.Material und Methoden 6.1.3). Anschließend wurden die VLPs im Coomassie Gel nachgewiesen und quantifiziert.

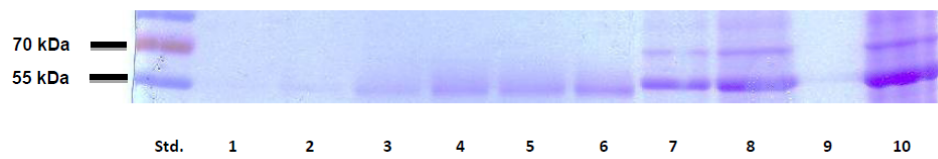


Abbildung 7.23.: Coomassie Gel zum Nachweis und zur Quantifizierung von IIIB-GFP-Gag-VLPs.

Std.: PageRuler Prestained Protein Ladder Fermentas 10-250 kDa

- (1) 5µg BSA
- (2) 10µg BSA
- (3) 20µg BSA
- (4) 30µg BSA
- (5) 40µg BSA
- (6) 50µg BSA
- (7) 5µl IIIB-GFP-Gag-VLPs
- (8) 10µl IIIB-GFP-Gag-VLPs
- (9) Geltasche nicht beladen
- (10) 20µl IIIB-GFP-Gag-VLPs

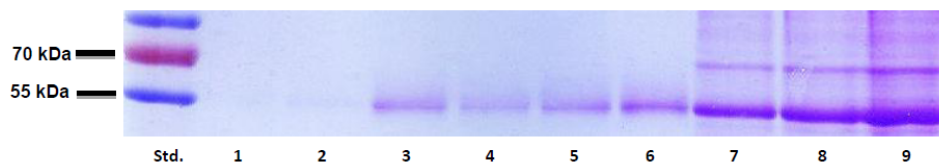


Abbildung 7.24.: Coomassie Gel zum Nachweis und zur Quantifizierung von ZM96-GFP-Gag-VLPs. Erwartete Bande für GFP-Gag bei 70 kDa

Std.: PageRuler Prestained Protein Ladder Fermentas 10-250 kDa

- (1) 5 µg BSA
- (2) 10 µg BSA
- (3) 20µg BSA
- (4) 30 µg BSA
- (5) 40 µg BSA
- (6) 50 µg BSA
- (7) 5 µl IIIB-GFP-Gag-VLPs
- (8) 10 µl IIIB-GFP-Gag-VLPs
- (9) 20 µl IIIB-GFP-Gag-VLPs

Es zeigte sich eine Bande bei einer Molekülgröße für 55 kDa, die den VLPs entsprach, die nicht mit GFP konjugiert waren. Eine weitere Bande knapp über der 70 kDa Bande repräsentiert die mit GFP (21 kDa) konjugierten VLPs. Beide Proben wurden mit der "Gel-Pro Analyzer Software" von *Media Cybernetics* vermessen. Dabei wurde für die ZM96-Gag-GFP-VLPs sowie die IIIB-Gag-GFP-VLPs eine Konzentration von 1 µg/µl ermittelt. Nachdem so die Produktion von gemischten GFP-VLPs erwiesen werden konnte, wurden die maturen DCs der Spender Nr. 5 und Nr. 6 mit 2 verschiedenen Probenmengen für 8 h inkubiert. Dazu wurden die Zellen bei 300 g zentrifugiert und resuspendiert und dann in einer Konzentration von 500 000 DCs pro Napfplattenfeld und Milliliter DC-Medium auf eine 24-Napfplatte aufgebracht. Abbildung 7.4 zeigt das Schema der Inkubation.

Napfplattenfeld	Eingesetzte Probenmenge 25 µg	Napfplattenfeld	Eingesetzte Probenmenge 50 µg
1	ZM96-GFP-VLPs	4	ZM96-GFP-VLPs
2	IIIB-GFP-VLPs	5	IIIB-GFP-VLPs
3	BSA	6	PBS

Napfplattenfeld	Eingesetzte Probenmenge 25 µg	Napfplattenfeld	Eingesetzte Probenmenge 50 µg
7	ZM96-GFP-VLPs	11	ZM96-GFP-VLPs
8	IIIB-GFP-VLPs	12	IIIB-GFP-VLPs
9	PBS	13	PBS
10	BSA	14	BSA

Abbildung 7.25.: Inkubationsschema von DCs mit GFP-VLPs
Spender 5 (oben) und Spender 6 (unten)

Nach 8 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und mit dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Dabei waren unter dem Mikroskop keine fluoreszierenden Zellgruppen erkennbar. Im Anschluss an die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und im FITC-Kanal mit dem Durchflusszytometer vermessen. Aufgenommen wurden 50 000 Zellen pro Probe. Es zeigte sich lediglich eine Fluoreszenz knapp über dem Niveau der Nega-

tivkontrollen bei einer maximalen Rate an fluoreszierenden DCs von 1,5%.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass der von der Firma *Genart* zur Verfügung gestellte GFP-gag-Vektor erfolgreich in 293F-Zellen exprimiert wurde. Mit dem Vektor konnten VLPs erzeugt werden, in die das GFP integriert war. Bei einem Verhältnis von GFP-Gag zu nicht GFP-Gag innerhalb der VLPs von 1:9, reichte die Leuchtkraft der Partikel jedoch nicht aus, um eine detektierbare Fluoreszenz in DCs zu generieren.

7.5. Experiment zur Prägung von naiven T-Zellen mit VLPs "in vitro"

Auf der Suche nach einer geeigneten HIV-Vakzine spielt die Grundlagenforschung eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang sollte in den hier durchgeführten Experimenten eine Methode etabliert werden, um naive T-Zellen "in vitro" zu kultivieren und gegen ein bestimmtes Antigen zu prägen. Diese Prägung beinhaltet eine Aktivierung der T-Zellen durch mature, antigenpräsentierende DCs. Dadurch erfolgt die klonale Expansion wobei Effektor-T-Zellen entstehen. Dieser Vorgang wird als "Priming" bezeichnet. Effektor-T-Zellen sind in der Lage nach Konfrontation mit einem bestimmten Antigen Zytokine zu produzieren, die dann eine weitere adaptive Immunantwort auslöst. Da die Prägung der T-Zellen von der Antigenpräsentation durch die DCs abhängig ist, wurden hier zunächst Experimente zur Maturation und Kulturhaltung von DCs durchgeführt.

7.5.1. Optimierung der Kulturhaltung und Maturation von DCs in FKS freiem Medium

Zur Kulturhaltung der DCs wurde in den Versuchen zur Testung der Aufnahme von VLPs ein Medium verwendet, das auf RPMI 1640 basiert. Dem Medium wurde für die DC-Kultur verschiedene Nährstoffe, unter anderem fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt (für die genaue Zusammensetzung s. 6.2. Material und Methoden). Versuche von Moser et al. 2009 hatten gezeigt, dass mit FKS eine Stimulation und Proliferation von T-Zellen in einer Kokultur mit DCs angeregt werden kann. Um zu verhindern, dass dieser Effekt die gezielte Stimulation der T-Zellen mit den getesteten Vakzinkandidaten überlagert, sollte für die Kulturhaltung der DCs ein FKS freies Medium verwendet werden. In Vorbereitung auf die DCs-T-Zell Kokultur wurden CD14⁺ Zellen wie im Abschnitt 6.2.1 aus dem Blut isoliert. Die Zellen wurden unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 für 4 Tage in verschiedenen etablierten FKS freien Medien kultiviert und zu

DCs differenziert.

An Tag 5 wurden die Zellen gezählt und mit TNF- α oder LPS maturiert. 48 h später wurden die Oberflächenrezeptoren CD80, CD86 und MHC II mit Antikörpern markiert und die Zellen im Durchflusszytometer vermessen. CD80 und 86, auch B7-1 und B7-2 genannt, sind wichtige Korezeptoren für die T-Zellstimulation und interagieren mit dem CD28 Rezeptor der T-Zellen.

Zunächst wurden aus 80 ml Blut des Spenders Nr.7 12×10^6 CD14⁺ Zellen isoliert. Zudem wurde Serum des gleichen Spenders gewonnen, dass anschließend 30 min bei 56°C erhitzt, 30 min bei 3000 g zentrifugiert und dann sterilfiltriert wurde. $2,38 \times 10^6$ Zellen wurden auf 5 Kulturflaschen aufgeteilt und nach dem in Abbildung 7.5.1 gezeigten Schema in je 4 ml der verschiedenen Medien kultiviert. 4 der Kulturen wurden in FKS freiem Medium kultiviert. Eine Kultur mit herkömmlichem DC-Medium diente als Referenz. Für das Medium in Kultur 5 wurde DC-Medium (Material und Methoden 6.2.1) ohne FKS hergestellt. Dem Medium wurden dann anstelle von 10 % FKS, 10% des filtrierten Eigenserum zugesetzt.

Zellkulturen	Getestet Medien
Kultur 1	Cell Gro Medium
Kultur 2	X-Vivo Medium ohne Panexin
Kultur 3	X-Vivo Medium mit Panexin
Kultur 4	DC Medium
Kultur 5	DC Medium ohne FKS, mit 10% Eigenserum

Abbildung 7.26.: Schema zur Kultur von CD14⁺ Zellen in verschiedenen FKS-freien Medien

Die Zellen wurden in den Brutschrank verbracht und für 48 h kultiviert. Dann folgte ein Mediumwechsel, wobei die Konzentration an IL-4 und GM-CSF konstant gehalten wurde. An Tag 4 der Kultur wurden die Zellen mit dem Lichtmikroskop untersucht.

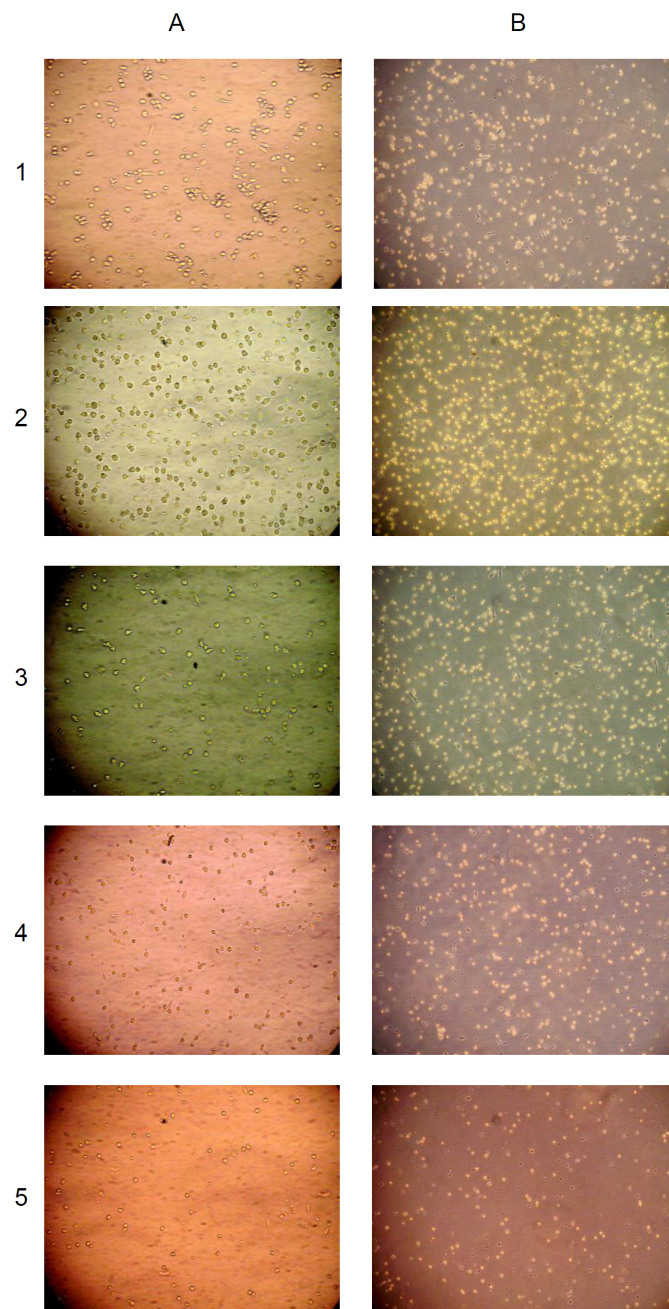


Abbildung 7.27.: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellkulturen
 A) 20-fache Vergrößerung B) 10-fache Vergrößerung
 1. DCs in Cell Gro Medium 2. DCs in X-Vivo Medium ohne NTS
 3. DCs in X-Vivo Medium mit NTS 4. DCs in DC-Medium mit FKS
 5. DCs in Medium mit Eigenserum

Die Konfluenz und Adhärenz der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop begutachtet (Abbildung 7.27). Die Zellen in Kultur 1 waren zu ca. 70% konfluent und zu 50% adhären. Ca. 10% der Zellen zeigten eine für DCs typische Morphologie mit Pseudopodien. Die Zellen der Kultur 2 zeigten eine Konfluenz von nur etwa 20% und waren zu ca. 90% adhären. Der größte Teil der Zellen hatte eine rundliche Form. Einige Zellen zeigten eine fibroblastenähnliche Morphologie, mit langen spitzen Ausläufern. Die Zellen in Kultur 3 zeigten eine Konfluenz von ca. 70% und waren zu 90% adhären. Morphologisch unterschieden sie sich kaum von den Zellen aus Kultur 2. Die Zellen in Kultur 4 zeigten eine Konfluenz von ca. 80% und waren zu 50% adhären. Die Zellen in Kultur 5 waren zu 90% konfluent und zu ca. 70% adhären. An Tag 5 wurden die Zellen der verschiedenen Kulturen in Reagenzgefäße überführt. Die Zellzahl in jeder Kultur wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 100 µl einer resuspendierten Zellkulturprobe mit 100 µl einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung vermischt. Es ergaben sich die in Abb. 7.28 dargestellten Zellzahlen.

Zellkultur	Gezählte Zellen an Tag 5 der Kultur
Kultur 1	$1,6 \times 10^6$
Kultur 2	$1,7 \times 10^5$
Kultur 3	$2,8 \times 10^5$
Kultur 4	$2,8 \times 10^6$
Kultur 5	$1,8 \times 10^6$

Abbildung 7.28.: In den Kulturen ermittelte Zellzahlen an Tag 5 nach Isolation aus dem Blut

Für die Kulturen in X-Vivo Medium waren die Zellzahlen im Vergleich zu den in anderen Medien kultivierten DCs niedrig. Die Ergebnisse der Zählung deckten sich mit den Beobachtungen unter dem Lichtmikroskop. Die Zellen wurden nun nach dem in Abbildung 7.29 gezeigten Muster auf eine 12-Napfplatte überführt.

Durch die Zugabe des Antigens LPS und des inflammatorischen Zytokins TNF- α sollten die DCs zur Expression von Oberflächenrezeptoren angeregt werden, die für die Stimulation von T-Zellen nötig sind. Dieser Prozess wird als Maturation bezeich-

Napfplattenfeld	Getestetes Medium	Stimulation mit	Zellen pro Napfplattenfeld
1	Cell Gro	TNF α	5×10^5
2	Cell Gro	LPS	5×10^5
3	Cell Gro	Keine Stimulation	5×10^5
4	DC Medium	TNF α	5×10^5
5	DC Medium	LPS	5×10^5
6	DC Medium	Keine Stimulation	5×10^5
7	Medium mit Eigenserum	TNF α	5×10^5
8	Medium mit Eigenserum	LPS	5×10^5
9	Medium mit Eigenserum	Keine Stimulation	5×10^5
10	X-Vivo ohne NTS	LPS	$1,0 \times 10^5$
12	X-Vivo ohne NTS	Keine Stimulation	$1,0 \times 10^5$
13	X-Vivo mit NTS	LPS	$1,5 \times 10^5$
14	X-Vivo mit NTS	Keine Stimulation	$1,5 \times 10^5$

Abbildung 7.29.: Schema zur Stimulation der DCs mit TNF- α oder LPS. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle

net. Nicht stimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle.

Ziel des Experimentes war es, jenes Medium zu ermitteln, in dem unstimulierte DCs die geringste Hintergrundaktivierung und beste Stimulierbarkeit bei Zugabe von Antigenen oder Zytokinen zeigten.

Die Zellen wurden nach der Stimulation für weitere 48 h in den Brutschrank verbracht. Dann wurden die Oberflächenrezeptoren CD80, CD86 und MHC II mit Antikörpern markiert und die Zellen im Durchflusszytometer vermessen. CD80 und CD86 spielen eine Schlüsselrolle in der Stimulation von T-Zellen und sind die Korezeptoren für den CD25-Rezeptor der T-Zellen. Die Expression von MHC II und diesen Rezeptoren ist Ausdruck der Reife der APC. CD86 wird schon in frühen Phasen der DC-Aktivierung exprimiert, während CD80 ein Marker für die muren DCs ist. Für die

Messung wurden 10 000 Zellen aufgenommen. Diese Zellzahl wurde für die Zellen in X-Vivo Medium mit oder ohne NTS nicht erzielt.

Um die Hintergrundaktivierung genauer zu untersuchen, war ein Teil der Zellen jeder der Kulturen nicht mit Antigen oder Zytokin stimuliert worden. Dabei zeigte sich die geringste Rezeptorexpression für die Zellen die in "Cell Gro Medium" kultiviert worden waren. Die höchste Rezeptorexpression zeigten die Zellen der Kultur mit Eigenserum. Die in "Cell Gro Medium" kultivierten Zellen zeigten vor allem in Bezug auf die Expression des MHC II Rezeptors eine gute Stimulierbarkeit. Bei einer Inkubation mit LPS exprimierten 23 % mehr Zellen den Rezeptor, als in der unstimulierten Probe. Für die in Eigenserum kultivierten Zellen zeigte sich hingegen kaum ein Unterschied zwischen den Expressionraten der unstimulierten und der stimulierten DCs. Der CD80 Rezeptor wurde nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ für die in "Cell Gro Medium" kultivierten Zellen sogar in geringerem Maß exprimiert, als in der unstimulierten Probe. Die Expression der anderen Rezeptoren konnte hingegen auch hier im Vergleich zur Negativkontrolle gesteigert werden.

Zusammenfassend zeigten die Zellen in "Cell Gro Medium" die geringste Hintergrundaktivität. Die Zellen konnten dennoch durch Antigen effektiv zur Maturation angeregt werden, weshalb für die folgenden Experimente "Cell Gro Medium" als Kulturmedium ausgewählt wurde.

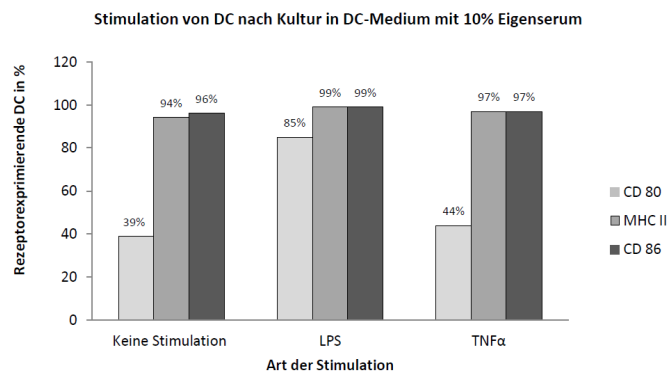
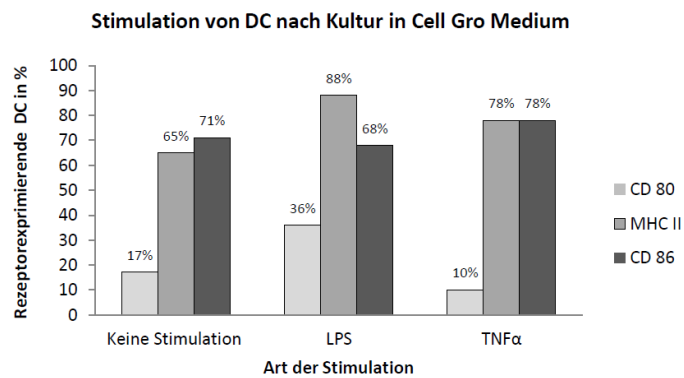
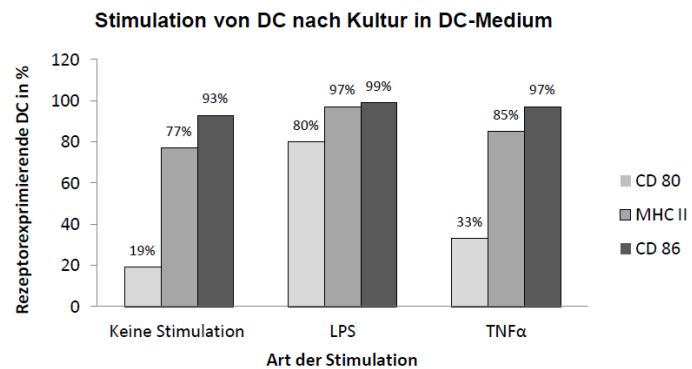


Abbildung 7.30.: Graphische Aufarbeitung der in der Durchflusszytometrie ermittelten Raten an receptorexprimierenden DCs in einer Kultur mit DC-Medium (oben), Cell-Gro Medium (mittig) und DC-Medium mit Eigenserum (unten). Gefärbt wurden die Rezeptoren CD80, CD86 und MHC II

7.5.2. Versuche zur Maturation von DCs

Die potente Stimulation von DCs ist ein Schlüsselfaktor für die effektive Antigenpräsentation und damit das Priming von naiven T-Zellen. Zur Maturation der DCs wurde den Zellen in den bereits beschriebenen Experimenten $\text{TNF-}\alpha$ zugesetzt. Darunter zeigte sich jedoch vor allem für den Rezeptor CD80 eine mit 10% geringe Expressionsrate für die in Cell Gro Medium kultivierten Zellen. In dem folgenden Experiment wurden Zellen deshalb unter dem Einfluss des sogenannten "Jonuleitcocktails" maturiert, der von Jonuleit et al. 1995 etabliert worden war. Der Cocktail beinhaltet die Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1 } \beta$, IL-6 und PGE-2 .

Für das Experiment wurden CD14^+ Zellen von Spender 6 nach bereits beschriebener Methode isoliert und unter dem Einfluss von IL-4 und GM-CSF in Cell Gro Medium kultiviert und zu DCs differenziert. Dann wurden jeweils 5×10^5 DCs in 500 μl Medium in das Napfplattenfeld einer 6-Napfplatte ausgebracht und mit dem "Jonuleitcocktail", $\text{TNF-}\alpha$ oder LPS inkubiert. In einem Napfplattenfeld wurden den Zellen nur Medium ohne Zytokine oder Antigen zugesetzt. Diese DCs dienten als Negativkontrolle. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD80, CD86 und HLA-DR gefärbt.

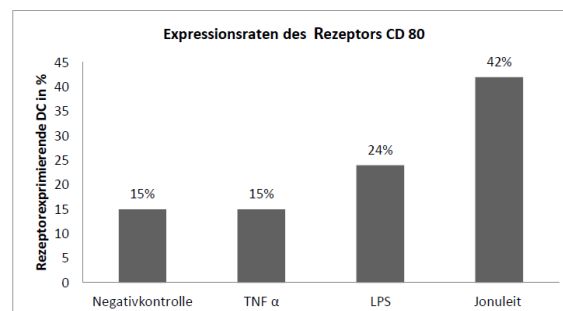


Abbildung 7.31.: Graphische Aufarbeitung der in der Durchflusszytometrie ermittelten Raten an DCs welche den Rezeptor CD80 exprimierten. Die Zellen wurden in Cell Gro Medium kultiviert und $\text{TNF-}\alpha$, LPS oder dem "Jonuleitcocktail" stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle.

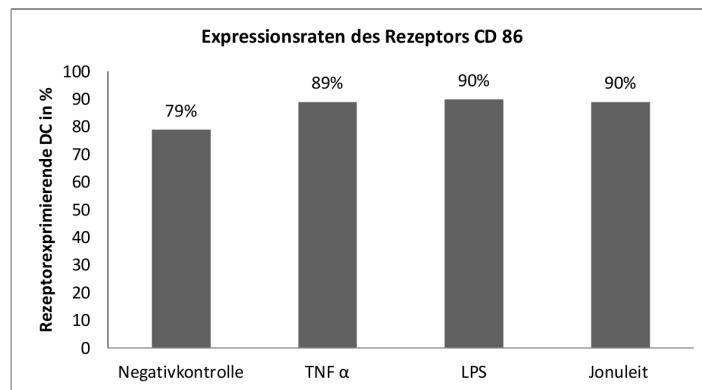


Abbildung 7.32.: Graphische Aufarbeitung der in der Durchflusszytometrie ermittelten Raten an DCs welche den Rezeptor CD86 exprimierten. Die Zellen wurden in Cell Gro Medium kultiviert und TNF- α , LPS oder dem "Jonuleitcocktail" stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle

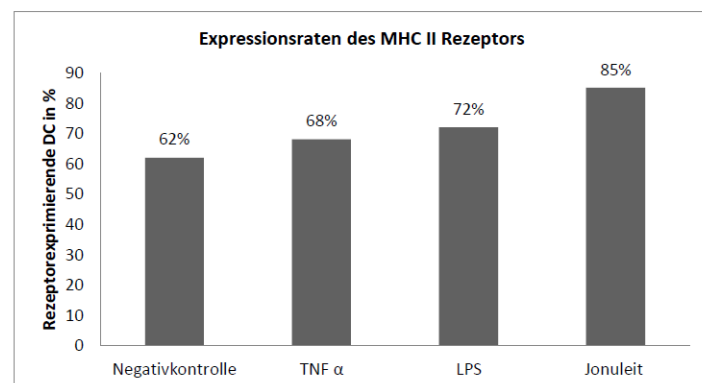


Abbildung 7.33.: Graphische Aufarbeitung der in der Durchflusszytometrie ermittelten Raten an DCs welche den Rezeptor MHC II exprimierten. Die Zellen wurden in Cell Gro Medium kultiviert und TNF- α , LPS oder dem "Jonuleitcocktail" stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle

In Bezug auf die Expression des CD80 Rezeptors und des MHC II Rezeptors zeigten sich die höchsten Expressionsraten für diejenigen Zellen, die mit dem "Jonuleitcocktail" maturiert worden waren. Dabei lag die Expressionsrate für den CD80 Rezeptor mit 42% nahezu doppelt so hoch, als für die Maturation mit LPS und annähernd 3 Mal so hoch, als für die Maturation mit TNF- α und die Negativkontrolle. Die Expressionsrate des MHC II Rezeptors war für die Maturation mit den "Jonuleitcocktail" 13% höher, als für die Maturation mit LPS und 17% höher, als für die Maturation mit TNF- α . Der Rezeptor CD86 wurde unabhängig von der Art der Stimulation in allen stimulierten Zellen zu etwa 90% exprimiert. In der Negativkontrolle lag die Expressionsrate bei 79%.

Zusammenfassend war die Expression der als Maturationsmarker verwendeten Rezeptoren CD80, CD86 und MHC II für die Zellen, welche mit dem "Jonuleitcocktail" maturiert worden waren genauso hoch (CD86) oder deutlich höher (MHC II, CD80), als für jene Zellen die nur mit TNF- α maturiert worden waren. Vor allem die Expressionsraten des CD80 Rezeptors konnten im Vergleich zur Maturation mit TNF- α deutlich gesteigert werden. Deshalb wurden die DCs in den folgenden Versuchen in Cell Gro Medium kultiviert und mit den "Jonuleitcocktail" maturiert.

7.5.3. Prägung naiver T-Zellen

In den hier durchgeführten Experimenten wurde die Methode von Moser et. al 2009 zur Prägung naiver T-Zellen gegen ein Antigen modifiziert.

Eine verbreitete Möglichkeit T-Zellen "in vitro" zu stimulieren, ist der sogenannte "PBMC-assay". Dabei werden humane T-Zellen mit unfractionierten gepulsten PBMCs kokultiviert. Der Begriff "pulsen" beschreibt im Folgenden einen Vorgang bei dem Zellen über einen bestimmten Zeitraum mit einem Antigen inkubiert werden. Zwar können so bereits geprägte T-Zellen restimuliert werden, jedoch gestaltet sich die Prägung von naiven T-Zellen gegen neue Antigene schwierig. Grund dafür ist, dass sich unter den PBMCs eine sehr heterogene Fraktion von APCs befindet, darunter hochpotente APCs wie DCs, aber auch wenig potente APCs wie B-Zellen. Diese Zellen okkupieren die naiven T-Zellen, ohne jedoch eine ausreichende Stimulation zu bewirken. Der Anteil an naiven T-Zellen an den zirkulierenden weißen Blutzellen ist gering und die Wahrscheinlichkeit für eine T-Zell Prägung in der Kultur sinkt, wenn T-Zellen und DCs nicht effektiv miteinander interagieren können [60]. In der Methode von Moser et al. 2009 werden deshalb keine PBMCs, sondern DCs zur Aktivierung der naiven T-Zellen verwendet, um die Rate an DCs-T-Zell Interaktionen zu erhöhen. Dabei zeigte die Arbeitsgruppe in verschiedenen Experimenten, dass ein Verhältnis von T-Zellen zu DCs von 60: 1 besonders günstig für die Kultur der T-Zellen ist. Bei der Isolation der T-Zellen wurden regulatorische CD25⁺ T-Zellen mittels des "Magnetic Cell Sorting" Verfahrens separiert und verworfen.

Der zeitliche Ablauf der Methode von Moser et. al war wie folgt: Zunächst wurden CD14⁺ Zellen isoliert und 5 Tage unter dem Einfluss von IL-4 und GM-CSF zu DCs differenziert. An Tag 5 wurde ein Teil der Zellen mit Antigen inkubiert. An Tag 6 wurde die Maturation der Zellen mit TNF- α unterstützt. An Tag 7 wurden mittels des MACS-Verfahren CD4⁺ T-Zellen gewonnen und die regulatorischen, CD25⁺ Zellen separiert und verworfen. Dann wurden DCs und T-Zellen für 14 Tage kokultiviert. An Tag 14 wurden erneut gepulste, oder ungepulste DCs zu den T-Zellen gegeben und mit diesen für 7 h Stunden kokultiviert. Um eine Ausschüttung von IFN- γ zu verhin-

dern, wurde der Zellkultur in den letzten 5 h Brefeldin A in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugesetzt. Anschließend wurden die T-Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen den CD4 Rezeptor, IFN- γ , IL-5, TNF- α , CD154, IL-17 und IL-21 gefärbt und mittels Durchflusszytometer untersucht.

In dieser Arbeit wurde ein in verschiedenen Punkten modifiziertes Protokoll verwendet. Die Kultur der Zellen erfolgte hier an Stelle von "X-Vivo Medium" in "Cell Gro Medium". (Zu den Gründen siehe Kapitel 7.5.1). Auch bezüglich der Maturation der DCs wurde das Protokoll von Moser et al verändert. Die Zellen wurden in den hier durchgeführten Experimenten mit Protein gepulst oder nicht gepulst, und 8h später mit "Jonuleitcocktail" zur Maturation angeregt, während bei Moser et al. eine Maturation mittels TNF- α erst 24 h nach der Inkubation mit Antigen erfolgte. Wie in Material und Methoden 6.3.2 beschrieben wurden die T-Zellen für die Kokultur gewonnen. Die Zellen wurden ebenfalls über 14 Tage kultiviert, erhielten aber nach Tag 7 einen zweiten Stimulus durch eine zweite Population maturer, gepulster DCs. An Tag 14 wurden die Zellen dann mit einer dritten Population an antigenbeladenen, oder nicht beladenen maturen DCs inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte wie bei Moser et al. eine Zugabe von Brefeldin A. Nach 7h wurden die Zellen extrazellulär gegen CD4 (AK CD4 V450 human; Pacific Blue; BD) und intrazellulär gegen CD154 (Anti human APC AK; BD) und IFN- γ (PE Mouse Anti-Human INF; BD) gefärbt. Abbildung 7.34 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf der T-Zellkultur, Abbildung 7.35

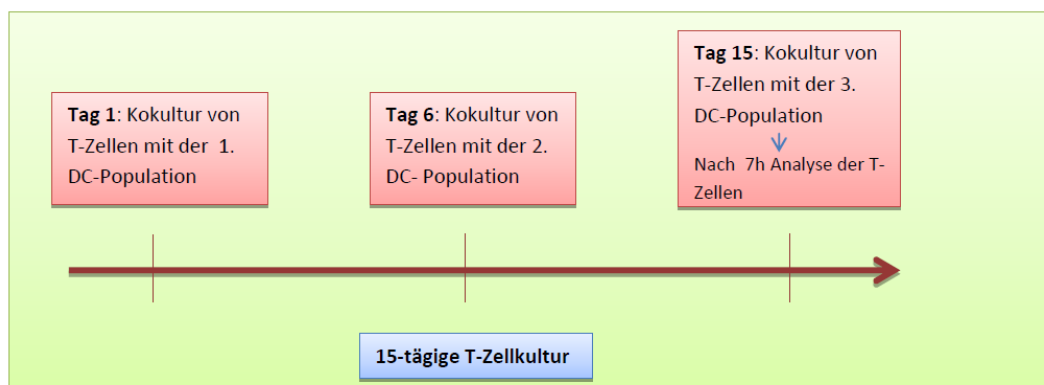


Abbildung 7.34.: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der T-Zellkultur

	Moser et al.	Modifiziertes Protokoll
Verwendetes Medium	X-Vivo-Medium	Cell Gro Medium
Maturation DCs mit:	TNF α	Jonuleitcocktail
Zeitlicher Abstand AG-Inkubation und Maturation DCs	24 h	8 h
Anzahl der Inkubationen mit AG-beladenen DCs	2	3
Gefärbte AK und Zytokine nach Restimulation	IFN γ , CD 4, CD 154, IL 5, TNF α , IL 17, IL 21	IFN γ , CD 4, CD 154

Abbildung 7.35.: Unterschiede zwischen dem Protokoll von Moser et. al und dem hier verwendeten modifizierten Protokoll

In Vorbereitung auf die Versuche wurde zunächst die Reinheit der isolierten T-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden T-Helferzellen aus 50 ml des Spenders 4 gewonnen. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben mittels MACS-Verfahren isoliert und dann mit AK gegen den CD4-Rezeptor gefärbt.

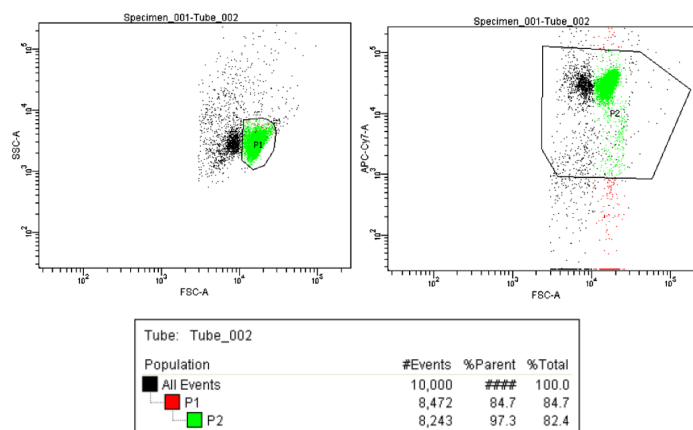


Abbildung 7.36.: Batch Analysis der mittels MACS isolierten CD4⁺ Th Zellen

Es zeigte sich eine Reinheit von 97,3 % T-Zellen (7.36).

Der zeitliche Ablauf der Versuche gliederte sich in 21 Versuchstage. In den verschiedenen Zellkulturen erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Dazu wurde jeweils die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. In der DC-Kultur wurde dem frischen Medium eine korrespondierende Menge an GM-CSF und IL-4 zugesetzt. An Tag 1 wurden drei verschiedenen, HIV-negativen Spendern (Spender 2,3 und 6) jeweils 50 ml Blut entnommen und CD 14⁺ Zellen gewonnen. Diese wurden in 96-U-Boden-Napfplattenfelder überführt und in 200 µl Cell Gro Medium wie weiter oben beschrieben kultiviert. An Tag 5 wurden die DCs (Population 1) mit Protein gepulst und 8 h später mit "Jonuleitcocktail" maturiert. An Tag 6 wurden PBMCs gewonnen, aus denen zunächst CD14⁺-Zellen isoliert wurden. Diese Zellen wurden dann in Medium überführt und in den Brutschrank verbracht. Aus den verbliebenen PBMC wurden nun T-Helferzellen gewonnen und zu den DCs der Population 1 gegeben. CD25⁺-CD4⁺ Zellen wurden zuvor separiert und verworfen. An Tag 11 wurden die DCs der Population 2 gepulst und wie bereits beschrieben mit "Jonuleitcocktail" maturiert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen von ihrer Kulturplatte in die Kultur der DCs der Population 2 überführt. An Tag 15 wurden erneut CD14⁺ Zellen generiert. Diese wurden an Tag 20 gepulst und maturiert. An Tag 21 wurden die T-Zellen aus der Kulturplatte der zweiten DC-Population in die Kulturplatte der dritten DC-Population überführt. Die Zellen wurden für 2 h inkubiert, dann wurde Brefeldin A zugegeben. Weitere 5 Stunden später wurden die Zellen geerntet, gefärbt und vermessen.

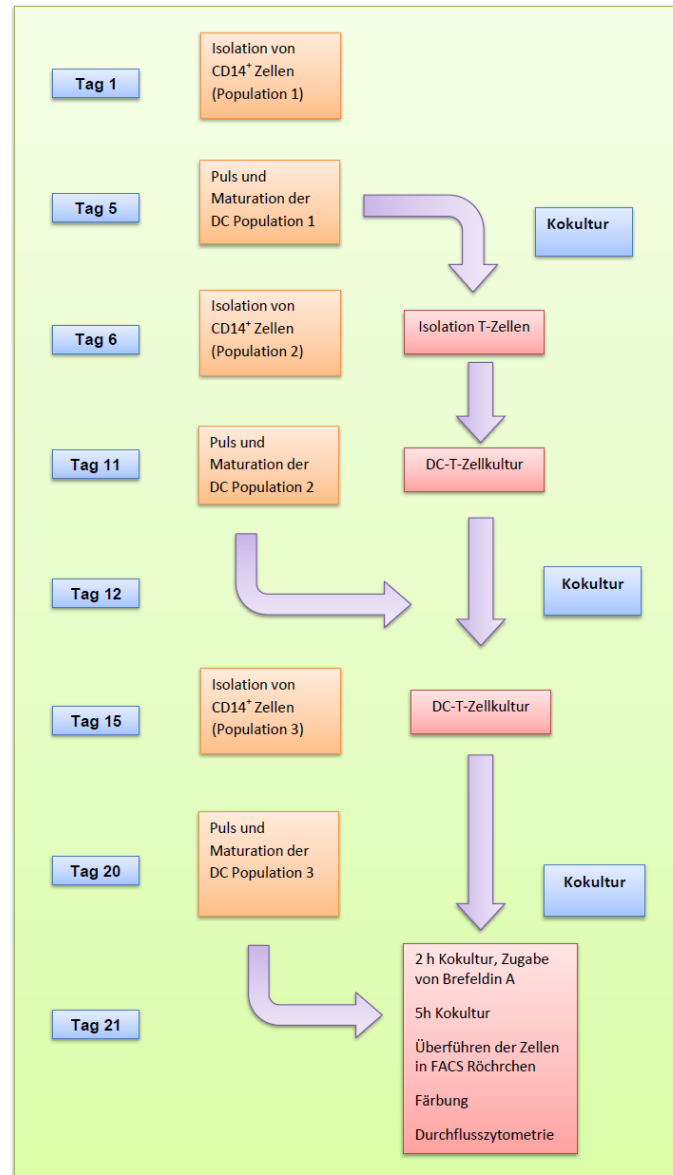


Abbildung 7.37.: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Experiments zum Priming von naiven T-Zellen

Schema	Puls 1	Puls 2	Puls 3
1	+	+	+
2	+	+	-
3	-	-	+
4	-	-	-

Abbildung 7.38.: Dargestellt ist das Schema nachdem die T-Zellen jeden Spenders mit DCs kokultiviert wurden. ' + ' steht für die Kokultur mit Antigen-gepulsten DCs ' - ' steht für eine Kokultur mit ungepulsten DCs

Die DCs wurden mit BV-VLPs, M-VLPs und Env inkubiert und dann mit den T-Zellen kokultiviert.

Das in Abbildung 7.38 gezeigte Schema 1 untersuchte, inwieweit durch 2 Inkubationen mit gepulsten DCs geprägte T-Zellen in der Lage sind, bei einer dritten Inkubation mit Antigen gepulsten DCs eine Zytokinantwort "in vitro" zu generieren. Durch Schema 2 sollte untersucht werden, welchen Einfluss die zweite Antigenpräsentation durch die DCs auf das Priming der naiven T-Zellen hat. Damit sollte auch die Stimulation der Zellen durch Puls 1 und 2 von der Restimulation der T-Zellen durch Puls 3 abgegrenzt werden. Schema 3 und 4 dienten als Negativkontrollen wobei vor allem Schema 3 eine wichtige Bedeutung zukam. Hiermit sollte die Reaktion von geprimten T-Zellen auf ihr Antigen von der spontanen Reaktion naiver T-Zellen auf ein bis dahin unbekanntes Antigen abgegrenzt werden. Da VLPs von einer Hülle aus Wirtszellmembran umgeben werden, wurde die Möglichkeit erwogen, dass eventuelle T-Zellantworten lediglich auf eine Reaktion der Zellen gegen Membranbestandteile der VLPs zurück zu führen seien könnten. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurden T-Zellen zwei Mal mit BV-VLPs oder M-VLPs stimuliert und an Tag 15 mit der jeweils anderen Sorte VLPs restimuliert. Als Positivkontrolle für die Versuche dienten Zellen des Spenders Nr. 6, bei dem nach eigenen Angaben in der Vergangenheit eine Infektion mit Tuberkulose Bakterien bestand. In Erwartung einer Restimulation von Gedächtniszellen des Spenders, wurden diese für die Positivkontrolle mit dem Tuberkulose Antigen H37 RV inkubiert.

Für die Färbekontrolle wurden die T-Zellen eines Napfplattenfeldes mit PHA-L (kurz für Phytohaemagglutinin) zur Produktion von IFN- γ angeregt und dann gefärbt. Die generierten Antworten der Zellen auf die verschiedenen Antigene wurden im Folgenden miteinander verglichen. Als Marker für die Antwort durch geprägte T-Zellen diente vor allem das Leitzytokin der Th1 Zellen, IFN- γ . Zudem wurde der Rezeptor CD154 auf den T-Zellen mit AK gefärbt. Dieser Rezeptor, wird auch als CD40 Ligand bezeichnet und erst exprimiert, wenn die T-Zelle durch Antigenkontakt aktiviert wurde. Pro Napfplattenfeld sollten jeweils 1×10^6 T-Helferzellen mit 17×10^3 DCs kultiviert werden, was einem Verhältnis von 1:60 entsprach.

Bei der Isolation der T-Zellen konnten die Zellzahlen jedoch für Spender 1 und Spender 2 nicht erreicht werden.

Spender	T-Zellzahl	T-Zellen / Lochplattenfeld	Verhältnis T/DC Zellen
2	$9,1 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	1:40
3	$17,0 \times 10^6$	$8,5 \times 10^5$	1:50
6	$8,8 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	1:25

Abbildung 7.39.: Dargestellt ist die Zahl der aus dem Spenderblut der Spender 2,3 und 6 isolierten T-Zellen und die absolute Anzahl an T-Zellen pro Napfplattenfeld, auch im Verhältnis zu den DCs

Das von Moser et al. 2009 als besonders günstig beschriebene Verhältnis von 60:1 von Helferzellen zu DCs konnte somit nicht erreicht werden. Die Versuche wurden mit den oben angegebenen Zellzahlen fortgeführt (Abb.7.39). Für Spender 2 musste auf jene Versuche verzichtet werden, bei denen T-Zellen 3x mit DCs inkubiert wurden, welche entweder immer mit M-VLPs oder immer mit BV-VLPs inkubiert worden waren. Um eine Immunantwort gegen Membranbestandteile der VLPs gegen die gewünschte Reaktion auf HIV Antigene abzugrenzen, wurden die T-Zellen zwei Mal mit den gleichen VLPs konfrontiert, also z.B. BV-VLPs und beim dritten Mal mit den jeweils anderen VLPs, also z.B. M-VLPs restimuliert.

Schema 7.40. gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau und die Färbungen. Es wurde auch verglichen, welchen Einfluss die Zelldichte, bzw. das Verhältnis von T-Helferzellen zu DCs auf die Prägung von naiven T-Zellen "in vitro" hat.

	Lochplattenfeld	Puls 1	Puls 2	Puls 3	Besondere Färbungen	
Spender 6	1	ENV	ENV	ENV		
	2	-	-	ENV		
	3	ENV	ENV	-		
	4	TB AG	TB AG	TB AG		
	5	BV-VLPs	BV-VLPs	BV-VLPs		
	6	-	-	BV-VLPs		
	7	BV-VLPs	BV-VLPs	-		
	8	-	-	TB AG		
	9	BV-VLPs	BV-VLPs	M-VLPs		
	10	-	-	M-VLPs		
	11	BV-VLPs	BV-VLPs	-		
	12	TB AG	-	TB AG		
	13	M-VLPs	M-VLPs	M-VLPs		
	14	-	-	M-VLPs		
	15	M-VLPs	M-VLPs	-		
	16	-	-	-	Oberflächlich	Intrazellulär
	17	M-VLPs	M-VLPs	BV-VLPs		
	18	-	-	BV-VLPs		
	19	M-VLPs	M-VLPs	-		
	20	-	-	-	ungefärbt	
Spender 2	21	ENV	ENV	ENV		
	22	-	-	ENV		
	23	ENV	ENV	-		
	24	-	-	-	Oberflächlich	Intrazellulär
	25	BV-VLPs	BV-VLPs	M-VLPs		
	26	-	-	M-VLPs		
	27	BV-VLPs	BV-VLPs	-		
	28	-	-	-	PHAL	Oberflächlich
	29	-	-	-	PHAL	ungefärbt
	30	M-VLPs	M-VLPs	BV-VLPs		
	31	-	-	BV-VLPs		
	32	M-VLPs	M-VLPs	-		
	33	-	-	-		
	34	-	-	-		
Spender 3	35	ENV	ENV	ENV		
	36	-	-	ENV		
	37	ENV	ENV	-		
	38	-	-	-	Oberflächlich	Intrazellulär
	39	BV-VLPs	BV-VLPs	BV-VLPs		
	40	-	-	BV-VLPs		
	41	BV-VLPs	BV-VLPs	-		
	42	-	-	-	ungefärbt	
	43	BV-VLPs	BV-VLPs	M-VLPs		
	44	-	-	M-VLPs		
	45	BV-VLPs	BV-VLPs	-		
	46	-	-	-	CD4 oberflächlich	
	47	M-VLPs	M-VLPs	M-VLPs		
	48	-	-	M-VLPs		
	49	M-VLPs	M-VLPs	-		
	50	-	-	-		CD4 intraz
	51	M-VLPs	M-VLPs	BV-VLPs		
	52	-	-	BV-VLPs		
	53	M-VLPs	M-VLPs	-		
	54	-	-	-		

Abbildung 7.40.: Überblick über die T-Zell/DC Kokulturen.”-“ steht für die Kokultur bei denen die DCs nicht mit Antigen inkubiert worden waren

Bis auf die in der Tabelle unter "besondere Färbungen" genauer beschriebenen Proben, wurden alle Proben extrazellulär mit CD4⁺ AK gefärbt (Pacific Blue). Dann wurden alle Proben mit Hilfe von Cytofix/Cytoperm Reagenz permeabilisiert und intrazellulär gegen IFN- γ und den Rezeptor CD154 gefärbt. Für die Versuche wurden mehrere Proben als Kontrollen gefärbt. Für jeden Spender wurde ein Napfplattenfeld mit ungepulsten Zellen nicht gefärbt, um die Hintergrundfluoreszenz der Zellen zu ermitteln. Ein Napfplattenfeld nicht gepulster Zellen wurde mit allen Antikörpern gefärbt, um die Expression der Rezeptoren, bzw. die Ausschüttung von IFN- γ in nicht stimulierten T-Zellen zu untersuchen. Als Positivkontrolle für die intrazelluläre Färbung gegen IFN- γ wurde eine mit PHA-L behandelte Probe gefärbt. An den Zellen der Napfplattenfelder 46 und 55 wurde der Einfluss des Färbezeitpunktes auf die Fluoreszenz des CD4 AK untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die Fraktion der IFN- γ positiven, CD4⁺ positiven Zellen beschrieben, da die Färbung des Oberflächenrezeptors CD154 nicht erfolgreich umgesetzt werden konnte. Es konnte aus ungeklärter Ursache keine Fluoreszenz der Zellen über dem Niveau der Negativkontrolle detektiert werden.

7.5.4. Statistische Auswertung

Innerhalb der verschiedenen T-Zellkulturen bestanden an Tag 15 stark variierende absolute Zahlen an $CD4^+$ T-Zellen. In Abb.7.5.4 ist der Anteil an $IFN-\gamma$ produzierenden $CD4^+$ T-Zellen als Funktion der absoluten Zahlen an $CD4^+$ T-Zellen in den T-Zell/DC Kokulturen am Tag 15 dargestellt.

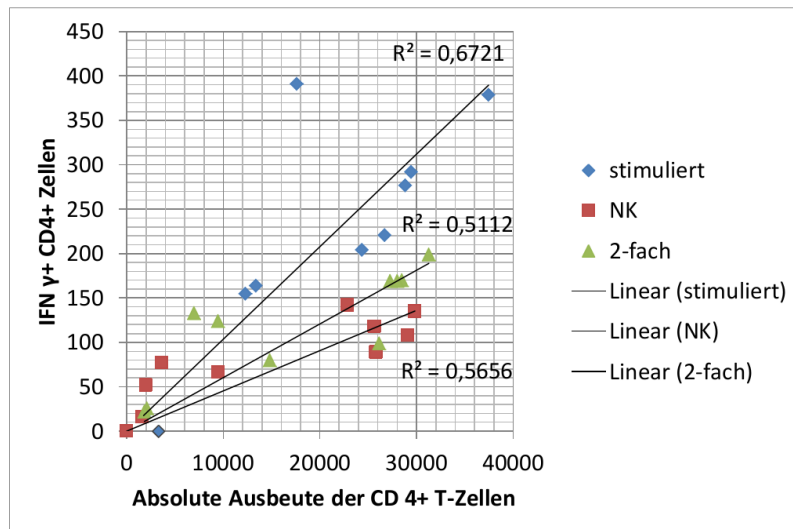


Abbildung 7.41.: Anteil an $IFN-\gamma$ produzierenden $CD4^+$ T-Zellen als Funktion der absoluten Zahlen an $CD4^+$ T-Zellen in den T-Zell/DC Kokulturen am Tag 15

Wie erwartet zeigte sich in den Zellkulturen mit höheren $CD4$ -T-Zellzahlen auch ein proportional höherer Anteil an $IFN-\gamma$ produzierenden Zellen, als für die Kulturen mit niedrigen Zellzahlen.

Wegen der hohen Streuung der Datenpunkte wurden die relativen Zahlen an $IFN-\gamma$ produzierenden $CD4^+$ T-Zellen (bezogen auf alle $CD4^+$ T-Zellen in der Kultur) für die verschiedenen Stimulationsschemata einem t-Test unterzogen. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied der $IFN-\gamma$ positiven T-Zellen bezogen auf die verschiedenen Stimulationsschemata ($p \gg 0,5$). Es zeigte sich für die Kulturen mit niedrigen Zellzahlen eine hohe Streuung des Anteils an $IFN-\gamma$ -positiven Zellen. Dies galt insbesondere wenn die Zellzahl in der Kultur unter 10 000 T-Zellen betrug (s. 7.42).

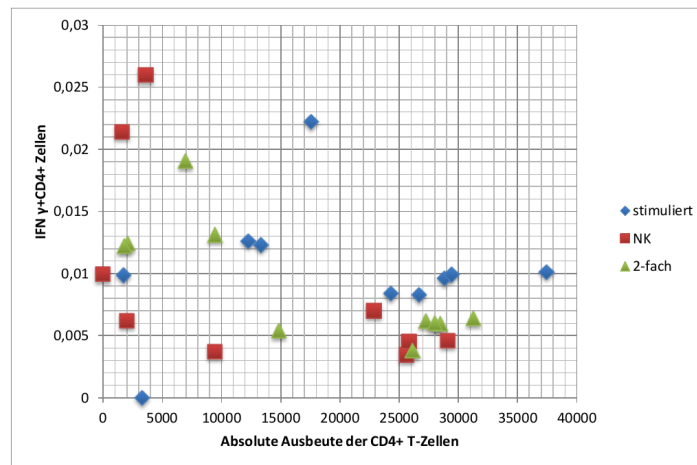


Abbildung 7.42.: Relativer Anteil an IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen als Funktion der absoluten Zahlen an CD4⁺ T-Zellen in den T-Zell/DC Kokulturen am Tag 15

Abbildung 7.43 zeigt die erhaltenen p-Werte ohne Ausschluss von T-Zellkulturen und nach Ausschluss der T-Zellkulturen mit unter 10 000 bzw. unter 20 000 CD4⁺ T-Zellen. Für den Ausschluss aller T-Zellkulturen mit unter 10 000 CD4⁺ Zellen ergab sich ein extrem hohes Signifikanzniveau ($p < 0.01$). In die folgende Auswertung wurden deshalb nur die Proben einbezogen, bei denen die Zahl der CD4⁺ T-Zellen über 10 000 betrug.

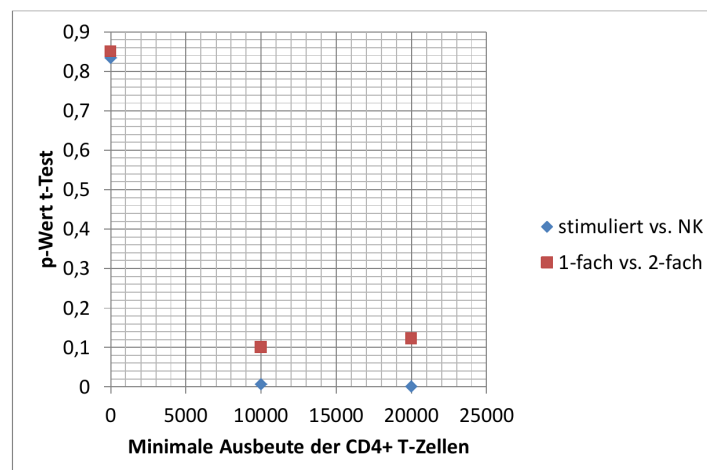


Abbildung 7.43.: p-Werte der verschiedenen Stimulationsschemata als Funktion der minimalen Ausbeuten an CD4⁺-T-Zellen innerhalb der Zellkulturen an Tag 15

Experiment zur Generierung von Effektor T-Zellen gegen das Antigen HIV Env

In die Auswertung können Proben von Spender 6 und 2 auf Grund zu geringer Zellzahlen nicht einbezogen werden. Für Spender 3 zeigte sich der höchste Anteil an IFN- γ produzierenden T-Zellen für das Stimulationsschema, bei dem T-Zellen zweimal mit Antigen gepulsten DCs kokultiviert worden waren. Auch für diese Zellkulturen lag der Anteil an IFN- γ produzierenden T-Zellen mit 0,6% nur knapp über dem Niveau der Negativkontrolle.

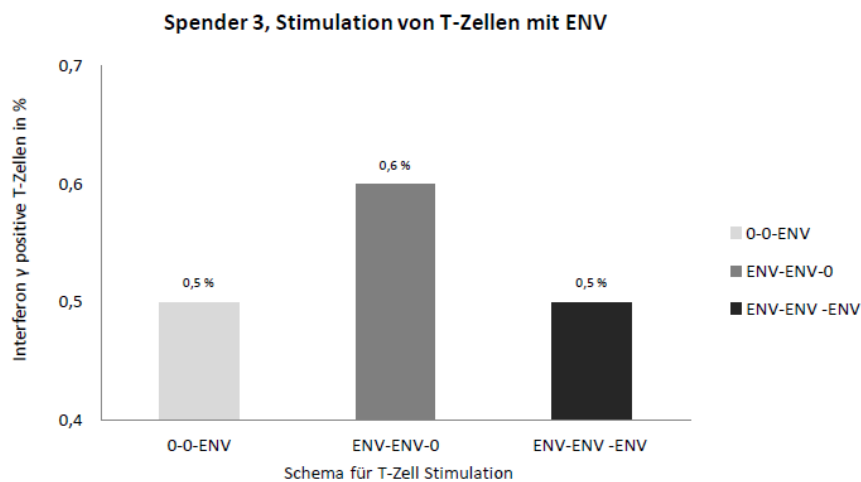


Abbildung 7.44.: Dargestellt ist der Prozentsatz an IFN- γ positiven T-Zellen in Relation zu der erfolgten Stimulation durch mit ENV gepulste oder nicht gepulste DCs.

Experiment zur Generierung von Effektor T-Zellen gegen BV-VLPs

Spender 6 konnte aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht mit in die Auswertung einbezogen werden. Abgebildet sind hier die Prozentsätze der IFN- γ produzierende T-Zellen der Spender 2 und 3, die zwei Mal mit BV-VLPs stimuliert und dann mit M-VLPs restimuliert wurden.

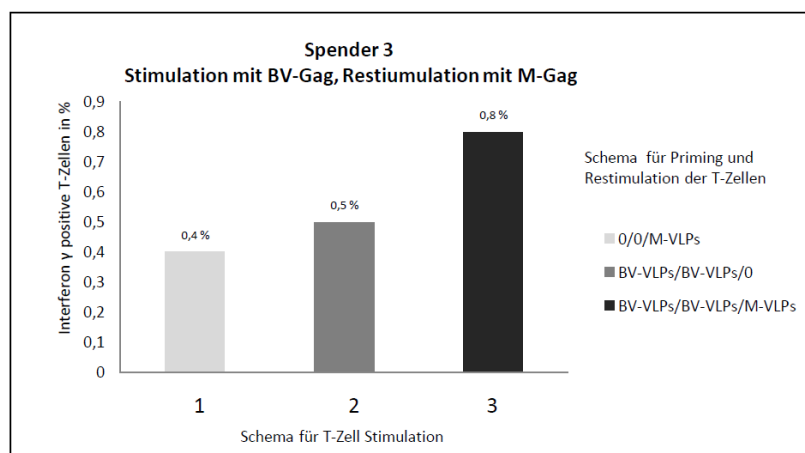
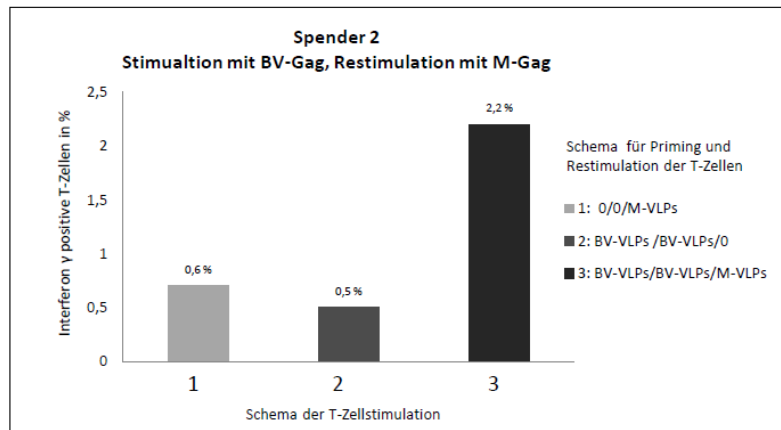


Abbildung 7.45.: Dargestellt ist der Prozentsatz an IFN- γ positiven T-Zellen als Funktion der erfolgten Stimulationen.

Spender 2 (oben) Spender 3 (unten)

Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern oberflächlich gegen den CD4 Rezeptor und intrazellulär gegen IFN- γ gefärbt und mit dem Durchflusszytometer vermessen.

Für Spender 2 zeigte sich der höchste Anteil an IFN- γ positiven T-Helferzellen für das Stimulationsschema 3. Die Rate an IFN- γ produzierenden T-Zellen war für eine Dreifachstimulation mehr als doppelt so hoch, als die Rate der Negativkontrolle. Auch für Spender 3 zeigte sich der höchste Anteil an IFN- γ positiven T-Helferzellen für das Stimulationsschema 3. Für Schema 2 lag die Rate an IFN- γ positiven T-Zellen unter der Rate für Schema 3 und über der Rate für Schema 1.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die vormals naiven T-Zellen beider Spender nach einer 14-tägigen Inkubation mit antigenstimulierten DCs in der Lage waren, auf eine erneute Antigenstimulation mit einer IFN- γ Produktion zu reagieren die deutlich über dem Niveau der Negativkontrolle lag.

Für Spender 3 wurde ein Telexperiment durchgeführt, bei dem T-Zellen zunächst gegen BV-VLPs geprägt wurden und dann mit DCs restimuliert wurden, welche mit BV-VLPs beladen waren. Es zeigte sich erneut ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Inkubationen und der Rate an IFN- γ produzierenden T-Zellen.

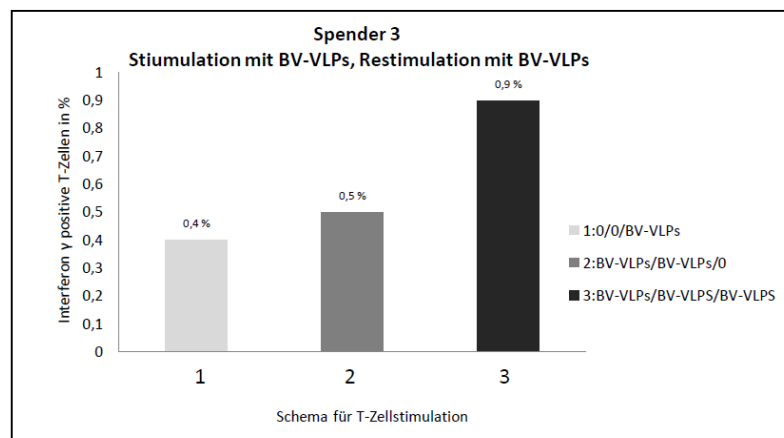


Abbildung 7.46.: Dargestellt ist der Prozentsatz an IFN- γ positiven T-Zellen als Funktion der erfolgten Stimulationen. Die Zellen wurden hier gegen BV-VLPs geprägt und mit BV-VLP beladenen DCs restimuliert

Experiment zur Generierung von Effektor T-Zellen gegen M-VLPs

Auch bei diesem Experiment konnten die Zellkulturen des Spenders 6 und 2 wegen zu geringer Zellzahlen der Negativkontrollen nicht in die Auswertung mit aufgenommen werden. Abb. 7.47 zeigt den Prozentsatz IFN- γ produzierender T-Zellen des Spenders 3 an Tag 15 des Experimentes. Ziel des Experimentes war es, naive T-Zellen gegen M-VLPs zu primen. Dazu wurden die Zellen jeweils gegen M-VLPs geprägt und dann entweder mit M-VLPs oder BV-VLPs restimuliert.

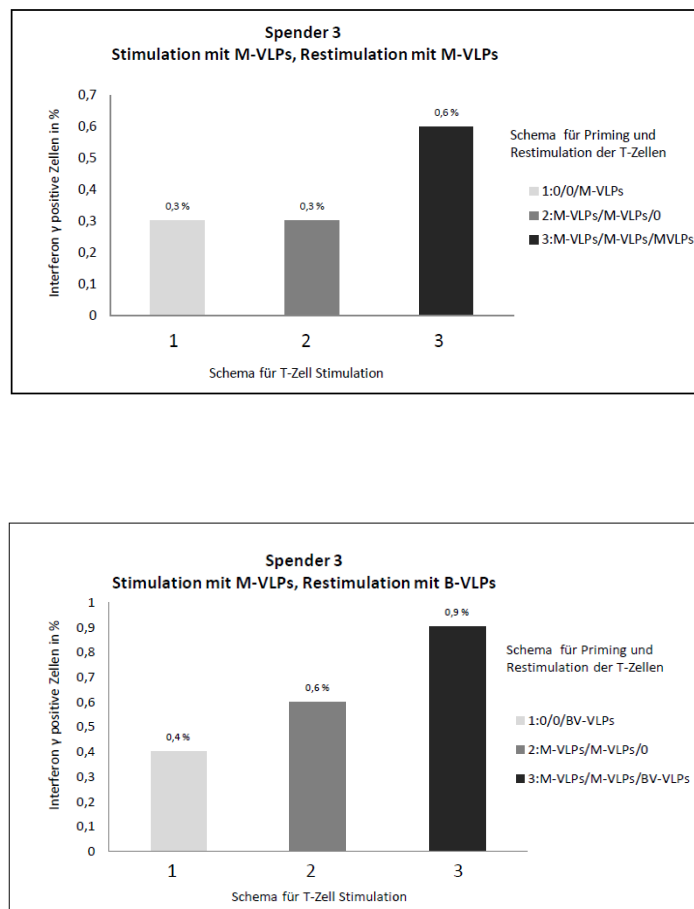


Abbildung 7.47.: Dargestellt ist der Prozentsatz an IFN- γ positiven T-Zellen des Spenders 3 in Bezug auf das Stimulationsschema. Die Zellen wurden gegen M-VLPs geprägt und dann mit M-VLPs (oben) oder BV-VLPs (unten) restimuliert. Nach der Restimulation wurden sie mit fluoreszierenden Antikörpern oberflächlich gegen den CD4 Rezeptor und intrazellulär gegen IFN- γ gefärbt und mit dem Durchflusszytometer vermessen.

In jener Kokultur, die mit M-VLPs restimuliert wurde, lag die Rate an IFN- γ produzierenden Zellen für die zweifache Stimulation auf dem Niveau der Negativkontrolle. Für die Kokultur die mit BV-VLPs restimuliert worden war, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Stimulationen und der Rate der an IFN- γ produzierenden Zellen. Während 0,4 % der unstimulierten T-Zellen IFN- γ produzierten, waren es in der zweifach stimulierten T-Zellpopulation 0,6 % und nach Restimulation 0,9 % der Zellen. Die Rate an IFN- γ produzierenden T-Zellen war für beide Teilexperimente mindestens doppelt so hoch wie die Rate der Negativkontrollen. In beiden Teilexperimenten konnten die Zellen des Spenders 3 erfolgreich gegen M-VLPs geprägt, und an Tag 15 restimuliert werden.

Experiment zur Generierung von Effektor T-Zellen gegen M-VLPs, Vergleich zwischen einer Restimulation mit M-VLPs und BV-VLPs

Das hier durchgeführte Experiment diente dazu, eine Prägung von T-Zellen auf HIV-Haptene in der Oberfläche der HIV-VLPs von einer Reaktion gegen Wirtszellmembranbestandteile der VLP-Hülle abzugrenzen. Dazu wurden T-Zellen gegen M-VLPs geprägt und dann an Tag 15 mit M-VLPs oder BV-VLPs restimuliert. Die Prozentsätze an IFN- γ positiven T-Zellen für die Restimulation wurden miteinander verglichen. Dieses Experiment konnte wegen der ansonsten zu geringen T-Zellzahlen nur für Spender 3 erfolgreich durchgeführt werden. Es bestand die Erwartung, dass die Zellen die hauptsächlich auf Hüllmembranbestandteile der M-VLPs geprimt worden waren, die Stimulation mit M-VLPs mit einer stärkeren IFN- γ Produktion beantworten würden als die Restimulation mit BV-VLPs.

Wurden Zellen des Spenders 3 zwei Mal mit M-VLP gepulsten DCs stimuliert, zeigten die Zellen bei der dritten Inkubation eine IFN- γ Ausschüttung die doppelt so hoch war, wie die der Negativkontrolle. Die Rate an IFN- γ produzierenden T-Zellen die zwei Mal mit DCs stimuliert worden waren lag auf Niveau der Negativkontrolle.

Um die T-Zellantwort gegen HIV-Gag von der Antwort gegen Zellmembranbestandteile in der Hülle der VLPs abzugrenzen, war ein Teil der auf M-VLPs geprimten

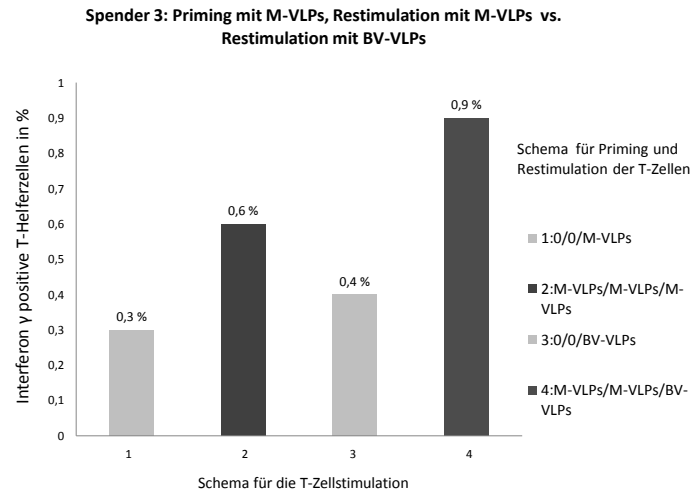


Abbildung 7.48.: Dargestellt ist die Rate an IFN- γ produzierenden, geprimten T-Zellen des Spenders 3 für eine Restimulation mit M-VLPs, bzw. BV-VLPs im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (Negativkontrolle entsprach ungeprimten T-Zellen nach einmaliger Stimulation mit BV-VLPs bzw. M-VLPs an Tag 15 des Experimentes)

T-Zellen mit BV-VLPs restumiliert worden. Es zeigte sich, dass der Anteil an IFN- γ produzierenden T-Zellen in der Population, die mit BV-VLPs restimuliert wurden höher war, als für die Population die mit M-VLPs restimuliert wurden. Damit kann davon ausgegangen werden, dass ein Priming der T-Zellen gegen die HIV-Haptene und nicht alleine gegen die Hüllbestandteile der VLPs erfolgte.

Experiment zur Generierung von Effektor T-Zellen gegen BV-VLPs, Vergleich zwischen einer Restimulation mit BV-VLPs und M-VLPs

In diesem Experiment sollte eine Prägung von T-Zellen gegen Insektenzellmembranbestandteile der BV-VLPs von einer Prägung gegen HIV-Gag-Haptene der BV-VLPs abgegrenzt werden.

T-Zellen des Spenders 3 wurden gegen BV-VLPs geprimt und dann mit BV-VLPs restimuliert. Es zeigte sich bei der Restimulation ein Prozentsatz von IFN- γ produzierenden Zellen die mit 0,9% über doppelt so hoch lag wie in der Negativkontrolle.

Es bestand ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Stimulationen und der Rate an IFN- γ produzierenden Zellen. Die Zahl an zweifach stimulierten T-Zellen lag über der Negativkontrolle jedoch unter der restimulierten Kontrolle. Zum Anderen wurden die Zellen gegen BV-VLPs geprimt und dann mit M-VLPs restimuliert.

Abb. 7.49 zeigt den Vergleich zwischen dem Prozentsatz an IFN- γ produzierenden Zellen für eine Restimulation mit BV-VLPs im Vergleich zu einer Restimulation mit M-VLPs. Die Antwort der T-Zellen bei einer Restimulation mit M-VLPs lag 0,1 % über der Antwort bei einer Restimulation mit BV-VLPs. Daraus kann gefolgert werden, dass die Prägung der T-Zellen gegen die HIV-Gag Bestandteile der VLPs und nicht gegen die Insektenzellmembran erfolgt war.

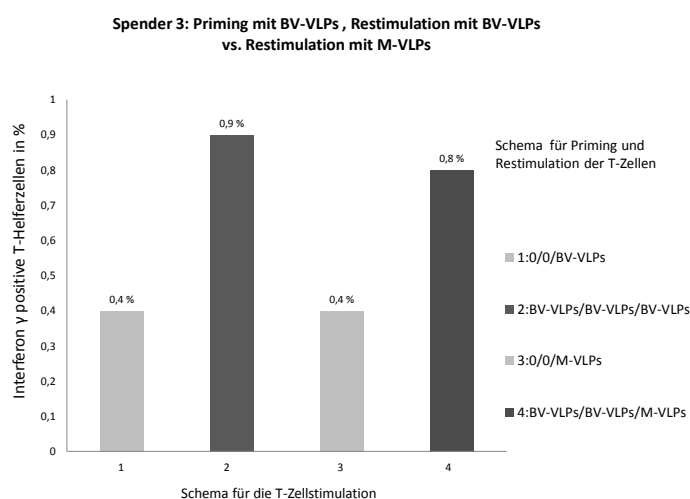


Abbildung 7.49.: Dargestellt ist die Rate an IFN- γ produzierenden, geprimten T-Zellen des Spenders 3 für eine Restimulation mit M-VLPs, bzw. BV-VLPs im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle (Negativkontrolle entsprach ungeprimten T-Zellen nach einmaliger Stimulation mit BV-VLPs bzw. M-VLPs an Tag 15 des Experimentes)

Zusammenfassung

Die Versuche konnten zeigen, dass sich eine Zelldichte von $4,4 \times 10^5$ Zellen pro 96-Napfplattenfeld negativ auf das Überleben der Zellen in einer 15-tägigen Kultur auswirkte. Mit Env konnten naive T-Zellen in den Versuchen in keinem der drei Spender effektiv geprägt werden. Eine Kultur der T-Zellen über 15 Tage mit Zellzahlen, die für eine statistisch signifikante Auswertung herangezogen werden kann, gelang für Env nur bei einem von drei Spendern und auch hier korrelierte die T-Zellantwort nicht mit der Stimulation der Zellen. Die Stimulation mit BV-VLPs und die Restimulation mit M-VLPs generierte in Spender 2 und 3 T-Helferzellantworten deutlich über dem Niveau der Negativkontrolle. Für die Stimulation mit M-VLPs und die Restimulation mit BV-VLPs zeigte sich bei Spender 2 eine starke Hintergrundaktivität der T-Zellen, in Spender 3 hingegen korrelierte die Antwort der Zellen gut mit der Anzahl der Stimulationen. Selbiges galt auch für die Proben in Spender 3, die drei Mal mit BV-Gag stimuliert wurden. Auch hier zeigte sich eine deutliche Antwort geprimter T-Zellen auf ihr Antigen. Für die Stimulation mit M-VLPs und die Restimulation mit M-VLPs zeigten die T-Zellen von Spender 3 ebenfalls eine IFN- γ Produktion deutlich über Niveau der Negativkontrolle, jedoch korrelierte die Antwort nicht mit der Anzahl der Stimulationen. So lag die Antwort der Zellen die nur zweifach stimuliert worden waren auf einem Niveau mit der Negativkontrolle. Zudem konnte gezeigt werden, dass Zellen die mit BV-VLPs geprimt worden waren nahezu gleich gut mit M-VLPs und BV-VLPs restimuliert werden konnten. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass ein Priming der naiven T-Zellen lediglich gegen die Hüllmembran der VLPs erfolgte. Bei jenen Zellen, die mit M-VLPs stimuliert worden waren, lag die IFN- γ -Ausschüttung dann am höchsten, wenn die Zellen mit BV-VLPs restimuliert wurden.

Teil IV.

Diskussion

30 Jahre nach dem Ausbruch der weltweiten HIV Pandemie konnten entscheidende Erfolge vor allem in Bezug auf die Behandlung von AIDS erzielt werden. Bis heute ist es jedoch noch nicht gelungen, einen sicheren und wirksamen Impfstoff zu entwickeln, um die Ausbreitung der Pandemie zu stoppen [28]. Dabei sollte eine ideale HIV-Vakzine hohen Sicherheitsstandards genügen und eine langanhaltende, flächendeckende Immunität induzieren. Diese Ziele konnten für die bisher in klinischen Studien getesteten Konzepte noch nicht erreicht werden. Getestet wurde eine Vakzine die aus dem Env-Protein gp120 bestand. Ziel war es, breit neutralisierende AK gegen das HIV-Env-Protein zu induzieren. In einer zweiten klinischen Studie waren rekombinante replikationsinkompetente Adenoviren, welche die Antigene Gag, Pol und Nef exprimierten, als Vakzine eingesetzt worden. Die getesteten Impfstoffe konnten weder die Neuinfektion mit Viren wirkungsvoll verhindern, noch die Viruslast infizierter Patienten senken [55, 31, 66, 71]. Die bisher erzielten Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Ziele in Bezug auf eine HIV-Vakzine dahingehend neu definiert werden müssen, dass eine sterile Immunität eventuell nicht erreicht werden kann. Ziel könnte es dann sein, eine bessere Kontrolle der Virämie in infizierten Personen zu erreichen [45]. Die Suche nach einem sicheren und wirksamen Impfstoff geht indes weiter.

In diesem Zusammenhang stellen VLPs eine mögliche Option dar. VLPs entstehen, wenn das HIV-Protein Pr55^{gag} in einer eukaryontischen Zelle produziert wird. Gag oligomerisiert zunächst über Protein-Protein und Protein-RNS Wechselwirkungen an der Innenseite der Wirtszellmembran. Durch Anlagerung weiterer Gag-Moleküle bildet sich langsam eine sphärische Struktur aus, die sich von der Zelloberfläche abschnürt. VLPs tragen keine RNA und sind nicht infektiös [9]. Sie werden von APCs aufgenommen, können diese aktivieren, zur Maturation anregen und so sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort induzieren [52]. Dies wurde auch von unserer Arbeitsgruppen in einer Reihe von Immunisierungsstudien mit Mäusen und Primaten gezeigt. In Mäusen konnten starke humorale Immunantworten mit Hilfe von VLPs induziert werden [21]. In der Arbeitsgruppe war es zudem gelungen eine lang anhaltende CTL Antwort in Rhesusaffen gegen multiple HIV-1 pr55Gag

Epitope zu erzeugen. Zwar konnte keine sterile Immunität erzielt werden, jedoch die Viruslast gesenkt werden [64].

Rhesusaffen, vor allem indischer Herkunft, gehören neben verschiedenen humanisierten Nagern zu einem der meist verwendeten Tiermodelle in der Erforschung von HIV [27]. Dabei werden Versuche an den Tieren oft mit SIV oder HIV/SIV chimären Viren durchgeführt. Auch wenn diese Modelle für die Erforschung bestimmter Zusammenhänge von großem Nutzen sind, werden sie doch durch die Tatsache limitiert, dass SIV und HIV-1 trotz vieler Gemeinsamkeiten unterschiedliche Viren sind [88]. Die einzigen Affen die mit HIV direkt infiziert werden können sind Schimpansen. Dabei entwickeln diese nach einer Infektion mit HIV jedoch nur selten AIDS [3]. Versuche an diesen unter Artenschutz stehenden Tieren werfen zudem ethische Fragen auf, sind kostspielig und nicht in breitem Umfang umsetzbar [27].

Die Entwicklung einer sensitiven und stabilen Methode um humane naive T-Zellen "in vitro" zu kultivieren und mit potentiellen Impfstoffen zu konfrontieren, könnte ein nützliches Mittel darstellen, um die Potenz von Impfstoffkandidaten in einem präklinischen Rahmen abzuschätzen. Potentielle Impfstoffe könnten dann vor den kostspieligen klinischen Test optimiert werden. In Bezug auf die Grundlagenforschung zum besseren Verständnis des Immunsystems spielen "in vitro" Modelle mit humanen Zellen eine wichtige Rolle und dienen als Ergänzung der im Tierversuch erlangten Erkenntnisse. In dieser Arbeit wurde deshalb eine Methode zum "in vitro Priming" von naiven T-Zellen gegen potentiellen HIV-1 Vakzine-Kandidaten entwickelt. Als Vakzine Kandidaten wurden VLPs und HIV-Env verwendet.

Die Grundlage jeder T-Zellantwort ist die effektive Präsentation von Antigenen durch DCs [5]. Deshalb wurde hier zunächst die Aufnahme von VLPs in DCs mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Dazu wurden VLPs zum einen mit CFDA markiert. Zum anderen wurde ein Plasmid-Vektor konstruiert, der für HIV-Gag und GFP kodierte. Die Expression des Proteins konnte durch die Fluoreszenz des GFP nachgewiesen werden. Anschließend wurden chimäre VLPs in 293T-Zellen produziert und deren Aufnahme in DCs untersucht.

7.6. Aufnahme von CFDA markierten VLPs in DC

Im ersten Teil des Versuches wurden DCs mit CFDA markierten M-VLPs inkubiert. CFDA-SE wird nach Aufnahme in das Zytoplasma von Zellen in CFSE umgewandelt, das mit Licht einer Wellenlänge von 488nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann. DCs die VLPs aufgenommen hatten konnten so mittels Durchflusszytometrie detektiert werden kann. Da für die folgenden Versuche VLPs zum Teil über längere Zeit bei -20°C gelagert werden sollten und in der Gebrauchsanweisung des Herstellers (*eBioscience*) von einem Auftauen des CFSE ausdrücklich abgeraten wird, wurde in einem Telexperiment untersucht, welchen Einfluss eine solche Behandlung auf die Fluoreszenz der markierten VLPs in DCs hat. In einem weiteren Versuchsteil wurde die Aufnahme von BV-VLPs mit der von M-VLPs verglichen.

Die Versuche konnten zeigen, dass die CFDA-markierten VLPs erfolgreich von DCs internalisiert werden konnten. Diese Beobachtung deckt sich mit denen anderer Arbeitsgruppen [13]. Nach 8 h Inkubationszeit hatten über 50% der DCs beider Spender CFDA-SE markierte M-VLPs aufgenommen. Die Aufnahme der VLPs war für die beiden untersuchten HIV-1 Isolate innerhalb jedes Spenders nahezu identisch. In einem Telexperiment wurde untersucht welchen Einfluss die Lagerung von VLPs bei -20 °C auf die Fluoreszenzeigenschaften der VLPs nach Aufnahme in DCs hat. Für die ZM96-Gag VLPs war der Prozentsatz an fluoreszierenden DC in beiden Spendern unabhängig von der Lagerung nahezu gleich. Für die 97 CN001-Gag VLPs fluoreszierten in beiden Spendern mehr Zellen in jenen Napfplattenfeldern, in denen eine Inkubation mit aufgetauten VLPs₋₂₀ erfolgt war. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Lagerung der CFDA-markierten VLPs keinen entscheidenden Einfluss auf deren Aufnahme und Fluoreszenzverhalten in DCs hat und CFDA auch nach einer Lagerung von -20°C erfolgreich in das fluoreszierende CFSE umgewandelt werden kann. Die DCs wurden jeweils nach 8 h Inkubationszeit untersucht. Mit weiteren Experimenten könnten DCs nach verschiedenen Zeitintervallen vermessen werden um das Maximum der VLP Aufnahme zeitlich festzulegen. Zusätz-

zlich könnten weitere Experimente durchgeführt werden, um die Prozessierung der VLPs und die Präsentation der daraus entstehenden Haptene an der Oberfläche der DCs genauer zu untersuchen, da darüber mit den hier verwendeten Methoden keine Aussage getroffen werden kann. Auch wäre eine Untersuchung der Sekretion von Zytokinen wie IL-12 während einer Inkubation von DC mit VLPs ein nützlicher Indikator dafür, inwieweit von einer effektiven Stimulation von T-Zellen durch VLP gepulste DC ausgegangen werden kann.

Für die in Insektenzellen produzierten VLPs konnte die Aufnahme in DCs durch die Durchflusszytometrie und unter dem Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. Im Durchschnitt hatten 58% der DCs markierte VLPs aufgenommen. In jedem Napfplattfeld in dem DC mit BV-VLPs inkubiert worden waren hatten dabei mindestens 44% der Zellen fluoresziert. Bei einer Inkubation mit BV-VLPs lagen die Raten an fluoreszierenden Zellen für eine Inkubation mit 97CN001-VLPs niedriger als für die ZM-96 VLPs.

Der Vergleich zwischen der Aufnahme von BV-VLPs und M-VLPs fiel uneinheitlich für die VLPs der unterschiedlichen Virusisolate aus. Es bestand die Erwartung, dass BV-VLPs in höherem Maße in DCs aufgenommen würden als M-VLPs. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass sich mittels Baculoviren in Insektenzellen produzierte VLPs aneinanderlagern. Dadurch werden von APCs wahrscheinlich gleich mehrere Partikel gleichzeitig aufgenommen. Zudem enthalten die Partikel das baculovirale Glykoprotein gp64. gp64 enthält Mannose, Fucose und N-Acetylglucosamin, aber keine Galaktose oder endständige Sialcylsäurereste und unterscheidet sich somit von der Glykosylierung die für Säugetierzellen typisch ist [44]. VLPs die gp64 in der Oberfläche gebunden enthalten, werden deshalb von professionellen APCs erkannt und über Phago- bzw. Makropinozytose aufgenommen [13].

Für die VLPs aus dem Virusisolat 97CN001 lag die Rate an fluoreszierenden DCs nach Inkubation mit M-VLPs um 14% höher, als nach der Inkubation mit BV-VLPs. Für die ZM96-Gag-VLPs verhielt sich die Aufnahmerate invers. Diese Beobachtung legt entgegen der Erwartung die Vermutung nahe, dass es keinen entscheidenden

Einfluss auf die Aufnahme hat, ob die VLPs in Sf9 Zellen mittels Baculoviren oder 293T-Zellen produziert werden. Um die Ergebnisse weiter zu validieren, sollten zusätzliche Versuche durchgeführt werden. Der erwartete Effekt von Insektenmembranbestandteilen als Adjuvants könnte sich zudem erst in der Antwort von T-Zellen auf die präsentierten VLP-Antigene zeigen.

7.7. GFP-VLP Projekt

Ein Nachteil des CFDA-Tests ist, dass keine Aussage über die genaue Quantität an aufgenommenen VLPs getroffen werden kann, da die Menge an CFDA, die an jedes VLP bindet nicht genau bestimmt werden kann. Somit korreliert die Aufnahme von CFDA-VLPs nicht direkt mit der Fluoreszenz der Zellen.

In Bezug auf das GFP gibt es bereits Referenzsysteme, mit denen sich Rückschlüsse von der ermittelten Fluoreszenz in Zellen auf die Anzahl der aufgenommenen GFP-Moleküle ziehen lassen [25]. GFP macht es möglich, die Aufnahme und Expression von DNA in lebenden Zellen nachzuweisen. Für die Expression von GFP sind keine zusätzlichen Kofaktoren nötig und es hat keinen negativen Effekt auf den Zellstoffwechsel [19]. Zudem ist es mit einer Größe von 238 Aminosäuren klein und emittiert bei passender Anregung grünes Licht, ohne dass dafür Färbeschritte nötig sind. In diesem Zusammenhang wurde es bereits umfangreich in der HIV-Forschung eingesetzt [4][56]. Werden die Gensequenzen für GFP unter der Kontrolle des HIV LTR-Promotors in das Genom von T-Zellen integriert, kann eine Infektion der Zellen mit HIV sichtbar gemacht werden. Werden die Zellen infiziert, kommt es zur Produktion des Transkriptionsfaktors Tat, der im Genom des Virus kodiert ist. Dieser führt nicht nur zu einem Ablesen der HIV-Gene, sondern auch dazu, dass die GFP-Gene hinter dem LTR-Promoter im Genom der Zellen abgelesen werden und GFP produziert wird. Diese kann dann mit ultraviolettem Licht zur Emission von Licht der Wellenlänge 509 nm angeregt werden kann. Alternativ dazu können die GFP Gensequenzen auch direkt in ein HI-Virus-Genom integriert werden [54].

Solche Experimente machen es möglich, sowohl das Infektionsverhalten von HIV, als auch die Wirkung von HIV-Medikamenten auf die Viruslast "in vitro" genauer zu untersuchen [35] [42] [20]. Zudem geben sie Aufschluss über die genauen Vorgänge beim Eindringen des Virus in die Wirtszelle, der Bildung des reifen Viruspartikels und dem Ausknospen aus der Wirtszelle. In Anlehnung an diese Versuche wurden in den hier durchgeführten Experimenten Gensequenzen für GFP in zwei verschiedene Plasmide integriert, die für das Gag-Protein der HIV Isolate IIB bzw. ZM96 unter der Kontrolle eines CMV Promotors kodierten. Das Prinzip der Immunisierung mit DNA Plasmiden beruht darauf, dass Fremdgene in Zellen eingebracht werden, die für virustypische Antigene kodieren. Diese können dann in der Zelle produziert- und dem Immunsystem zugänglich gemacht werden [1]. Die Antigene werden auf dem MHC I Rezeptor präsentiert, wodurch die APC in der Lage ist, eine CTL-Antwort zu induzieren [13]. DNA-Impfstoffe gelten als gut verträglich und in der Herstellung kostengünstig. Mit Impfstoffen diesen Typs wurden im Zusammenhang mit HIV bereits klinische Studien durchgeführt [89]. Die hier verwendeten DNA-Vektoren wurden in 293F-Zellen eingebracht und dazu genutzt, Gag-Protein zusammen mit GFP zu produzieren. Die Verwendung von GFP-gekoppelten DNA Impfstoffen hätte entscheidende Vorteile. Solche Impfstoffe könnten zum Beispiel mukosal verabreicht werden. Anschließend könnte durch eine Detektion des GFP in Gewebeproben aus dem geimpften Areal untersucht werden, inwieweit der DNA-Impfstoff von den Zellen aufgenommen und abgelesen wurde. Dies würde es auch ermöglichen, den zeitlichen Verlauf und die Effektivität der Antigenbildung nach einem Einbringen der Vakzine genauer zu bestimmen. Gleichzeitig könnte die Aufnahme des Antigens -in diesem Fall das HIV-Protein Gag- in APCs genauer untersucht werden. In den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die rekombinante GFP-Gag-DNA erfolgreich in 293F-Zellen abgelesen werden konnte.

Da sich ein zu hoher Anteil an GFP-Gag negativ auf die Stabilität und Bildung von VLPs auswirkt, wurde der GFP-Gag-DNA Vektor zur Produktion von VLPs nicht alleine eingesetzt. 293F-Zellen wurden zur Produktion der GFP-VLPs mit 9 Anteilen

Gag-DNA und einem Anteil GFP-Gag-DNA transfiziert. In den anschließend durchgeführten Westernblots zeigten sich jeweils Banden, die auf die Bildung von GFP-enthaltenden VLPs schließen ließen. Die VLPs wurden danach zur Inkubation mit DCs eingesetzt. In den DCs konnte nach einer achtstündigen Inkubation mit den chimären GFP-VLPs jedoch keine Fluoreszenz im Durchflusszytometer detektiert werden. Diese Tatsache ist dabei am wahrscheinlichsten auf einen zu geringen Anteil an GFP in den VLPs zurückzuführen. Durch weitere Versuche mit einem höheren Anteil an GFP sollte diese Tatsache genauer untersucht werden.

7.8. Experiment zur Prägung naiver T-Zellen gegen HIV-Antigene

7.8.1. Versuche zur Kulturhaltung von humanen DCs

Ein grundlegendes Verständnis für das Immunsystem ist unerlässlich für die Entwicklung von Impfstoffen. Dabei stützen sich Experimente häufig auf Labortiere. Ergebnisse sind dabei jedoch nur bedingt auf das menschliche Immunsystem übertragbar [27]. Auch aus ethischen Gründen stellen "in vitro" Modelle des menschlichen Immunsystems einen nützlichen Beitrag zur präklinischen Erforschung potentieller Impfstoffkandidaten dar. Ein solches Modell ist der sogenannte "PBMC-Assay" bei dem alle einkernigen Zellen des peripheren Blutes isoliert und mit Antigen konfrontiert werden. Darunter fallen zum Beispiel Lymphozyten, Monozyten oder Makrophagen. Mit dieser Methode gelingt es jedoch nicht, naive T-Zellen gegen ein Antigen zu prägen [60]. Die Prägung naiver T-Zellen ist jedoch die Grundlage für die adaptive Immunantwort die durch einen Impfstoff induziert wird und den Organismus später vor der Infektion schützt. Die Tatsache, dass eine Prägung "in vitro" nicht erzielt werden kann beruht vermutlich darauf, dass die dafür essenzielle Interaktion zwischen DC und T-Zelle in einem Zellgemisch nicht effektiv genug stattfindet [60]. Die hier verwendete modifizierte Methode nach Moser et al. 2009 geht auf dieses Problem ein, indem T-

Zellen und DCs aus dem Zellgemisch der PBMCs isoliert werden. Dadurch erhöht sich die Option zum Kontakt zwischen APC und antigenspezifischer naiver T-Zelle. Auf diese Weise konnten in den von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten Erfolge in Bezug auf die Prägung von T-Zellen gegen verschiedene bereits auf dem Markt erhältliche Vakzine "in vitro" erzielt werden. Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Methode zu modifizieren und für die Erprobung einer potentiellen HIV-VLP Vakzine "in vitro" zu nutzen.

In Vorbereitung auf diese Versuche optimierten wir die Kulturhaltung und Maturation von DCs in serumfreien Medium. Die Wahl des Mediums spielt eine wichtige Rolle für die Erprobung potentieller Vakzinekandidaten. Versuche von Moser et al. 2009 hatten gezeigt, dass mit FKS eine Stimulation und Proliferation von T-Zellen in einer Kokultur mit DCs angeregt werden kann. Um zu verhindern, dass dieser Effekt die gezielte Stimulation der T-Zellen mit den getesteten Vakzinkandidaten überlagert, sollte für die Kulturhaltung der DCs ein FKS freies Medium verwendet werden. Während Moser et al. 2009 X-Vivo Medium für ihre Zellkultur verwendeten, konnten DCs innerhalb der hier durchgeführten Versuche aus ungeklärter Ursache nicht in diesem Medium kultiviert werden (Zelltod s. 7.5.1). Es wurden deshalb Experimente mit folgenden weiteren fremdserumfreien Medien durchgeführt: Cell Gro Medium, DC-Medium unter Zusatz von Spenderserum und DC-Medium ohne Zusatz von Spenderserum. Dabei wurden DC-Vorläuferzellen aus dem Blut isoliert und kultiviert und anschließend mittels TNF- α zur Maturation angeregt. Als Positivkontrolle dienten Zellen die mit dem Endotoxin Lipopolysacharid inkubiert wurden. LPS bindet an den CD14 Rezeptor und aktiviert die rezeptortragenden Zellen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit Antigen oder Zytokin inkubiert wurden. Es zeigte sich eine unspezifische Aktivierung von CD14⁺ Zellen alleine durch den Zusatz von Eigenserum. Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. Eigenserum bringt zusätzlich den entscheidenden Nachteil mit sich, dass die Zusammensetzung nicht genau bestimmt werden kann, so dass es nur schwer möglich ist, konstante Kulturbedingungen zu generieren. Zudem konnten andere Ar-

beitsgruppen zeigen, dass eine Kultur in Eigenserum zu einer Herabregulation des CD1a Rezeptors führt, der zur Familie der MHC I-Rezeptoren gehört, und für die Stimulation von T-Zellen durch lipidhaltige Antigene verantwortlich ist [49][63][30].

Zellen in Cell Gro Medium zeigten die geringste Hintergrundaktivität, auch im Vergleich zu DC-Medium ohne den Zusatz von Eigenserum. Die Zellen konnten gleichzeitig durch Antigen gut zur Maturation angeregt werden, weshalb für die folgenden Experimente Cell Gro Medium als Kulturmedium ausgewählt wurde. In einem ersten Experiment (Ergebnisse nicht gezeigt) war es nicht gelungen, T-Zellen mit der Methode von Moser et al. 2009 gegen die potentiellenn HIV-Vakzine zu prägen. Es konnte keine T-Zellaktivität über dem Niveau der Negativkontrollen induziert werden. Als Ursache wurde unter anderem eine insuffiziente Maturation von CD14⁺ Zellen und eine daraus resultierende insuffiziente Antigenpräsentation angenommen. Wir führten deshalb ein Experiment durch, in dem wir die bisher verwendete Methode zur Maturation von CD14⁺ Zellen unter dem Einfluss von IL-4 und TNF- α (s. 6.2.1) mit einer Maturation unter dem Einfluss des "Jonuleitcocktails" verglichen. Jonuleit et. al hatten bereits 1997 berichtet, dass eine Zytokingemisch von TNF- α IL-1 β , IL-6 und PGE2 die Maturation, Migration und die immunstimulatorische Kapazität von DCs verbesserte. Durch die Kokultur mit so maturierten CD14⁺ Zellen konnte zudem eine höhere Interferon γ Produktion in aktivierten T-Zellen beobachtet werden. Als Ausdruck einer besseren Maturation der DCs zeigte sich auch in den hier durchgeführten Versuchen, eine deutlich höhere Expression der für die Aktivierung von T-Zellen entscheidenden Rezeptoren CD80, CD86 und MHC II (s. 7.5.2). Die Maturation der DCs erfolgte im folgenden Experiment deshalb mit dem "Jonuleitcocktail". Eine weitere Veränderung innerhalb der Versuche zur Prägung von naiven T-Zellen betraf den Zeitpunkt, an dem den DCs TNF- α zugesetzt wurde. Während im ersten Versuchsaufbau (Ergebnisse nicht gezeigt) Antigen und TNF- α gleichzeitig zu den DCs gegeben wurden, inkubierten wir im zweiten Versuchsaufbau die unmaturierten DCs mit Protein, bevor wir die Zellen mit TNF- α zur Maturation anregten. Schlinger et. al hatten gezeigt, dass eine Antigenbeladung der DCs vor der Maturation essentiell für eine effektive Stimu-

lation von CD4⁺ T-Zellen ist [48].

7.8.2. Versuche zur Prägung von naiven humanen T-Zellen

Als potentielle Impfstoffkandidaten testeten wir VLPs die zum einen in Säugetierzellen und zum anderen in Insektenzellen produziert worden waren. Als drittes Antigen verwendeten wir HIV-ENV. Die Experimente wurden in drei verschiedenen Spendern durchgeführt, wobei DCs und T-Zellen für 15 Tage kokultiviert wurden. Für die Versuche wurde die Gruppe der CD25⁺ regulatorischen T-Zellen separiert und verworfen, da diese die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen hemmen. Ursache dafür ist wahrscheinlich die Unterdrückung der IL-2 Sekretion, die für die Aktivierung und Differenzierung von CD4⁺ Zellen essentiell ist [86]. Das Verhältnis von T-Zellen zu DCs variierte innerhalb der Spender aufgrund von Schwankungen bei der Isolation der T-Zellen. Die Werte für das Überleben in der T-Zell/DC-Kultur zeigten einen Trend hin zu höherem Überleben der T-Zell, bei höheren Anfangszellzahlen für die T-Zellen. Die Bedeutung der Zelldichte für die erfolgreiche Kultur von T-Zellen "in vitro" wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [53]. Ohne weitere Stimulation durch Zytokine oder Antigene überlebten im Mittel nur 0,35% der T-Zellen in einer Kultur, mit einem DC:T-Zellverhältnis von 1:25. Hingegen waren es bei einem DC:T-Zell Verhältnis von 1:40 2% und bei einem Verhältnis 1:50 3,5% der anfangs ausgebrachten Zellen. Die Beobachtung, dass sich ein zu hohes Verhältnis von T-Zellen zu DCs negativ auf das Überleben der T-Zellen in der Kultur auswirkt, decken sich mit den Experimenten von Moser et al. [60]. Dabei ist die geringe Viabilität der T-Zellen vermutlich auf einen zu hohen Stoffwechselumsatz der DCs zurückzuführen. Während sich das Nährstoffangebot für die T-Zellen verknappt, herrschen gleichzeitig hohe Konzentrationen an Stoffwechselendprodukten in der Kultur. Für die Kulturen von Spender 6 und Spender 2, bei denen ungünstige Kulturbedingungen herrschten, zeichnete sich ein Zusammenhang zwischen mit Protein stimulierten und unstimulierten Zellen in Bezug auf das Überleben in der Kultur ab. In den Kulturen, die im Laufe der 15 Tage nicht mit antigenbeladenen DCs kokultiviert wurden, war das Überleben signifikant

niedriger als für diejenigen Zellen, die mit gepulsten DCs kultiviert wurden (signifikant = P-Wert < 5% im T-Test). Dieser Zusammenhang war für die Zellen des Spenders 3, nicht nachweisbar (P-Wert = 95% im T-Test). Möglicherweise spielte für die Viabilität der T-Zellen unter ungünstigen Kulturbedingungen bezüglich Zelldichte und T-Zell-DC-Verhältnis der Aktivierungszustand von DCs durch das Antigen eine wichtigere Rolle.

In den Kulturen mit unter 10 000 CD4⁺ Zellen zeigte sich eine breite Streuung der Datenpunkte für die relativen Zahl an IFN- γ produzierenden CD4⁺-Zellen bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen in der Kultur. Für den Ausschluss aller T-Zellkulturen mit unter 10 000 CD4⁺ Zellen ergab sich hingegen ein extrem hohes Signifikanzniveau ($p < 0.01$). Da die Zellzahl von 10 000 CD4⁺ Zellen für Spender 6 in keiner der Negativkontrollen erreicht werden konnte, wurden die Ergebnisse aus den Versuchen mit diesem Spender nicht in der Auswertung gezeigt.

Gleiches galt für die Zellen des Spender 2, die mit Env stimuliert worden waren. Für Spender 3 konnte durch die Stimulation mit Env lediglich eine IFN- γ Produktion auf Niveau der Negativkontrolle erzielt werden. Grund dafür könnte eine geringe Immunogenität von löslichem Env sein. Zwar sind einzelne lösliche Peptide immer wieder Teil von Vakzintests, weil sie Sicherheitsbedenken standhalten können, jedoch sind sie häufig nur wenig immunogen und dadurch meist nicht in der Lage, eine zelluläre Immunantwort zu induzieren [10] [13]. Möglicherweise hätte für eine effektivere Prozessierung und Präsentation des HIV-Env-Proteins ein größerer zeitlich Abstand zwischen der Inkubation der DCs mit dem Antigen und der Maturation durch TNF- α eingehalten werden müssen. Während in unserem Aufbau TNF- α bereits nach 8 h zugesetzt wurde, waren es im Versuchsaufbau von Moser et al. 24 h. Ein weiterer möglicher Grund für das unzureichende Überleben und die nur geringe Stimulation der T-Zellen könnte eine Suppression der T-Helferzellproliferation durch das HIV-Env-Protein sein, wie sie in Experimenten von Fernando et al. 2007 beschrieben wurde [29]. Die in der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuche zeigen, dass die Proliferation von T-Helferzellen gehemmt wird, wenn den Zellen mit HIV-ENV-beladenen DCs

kokultiviert werden. Dabei gehen Fernando et al. davon aus, dass dieser Effekt durch eine Interaktion von ENV mit dem CD4 Rezeptor vermittelt wird.

Innerhalb der Experimente, gelang es vormals naive T-Zellen HIV negativer Spender erfolgreich gegen BV-VLPs zu primen. Als Indikator für die Restimulation diente das Leitzytokin der Th1-Helferzellen IFN- γ . Zwei Wochen nach der DCs/T-Zellkultur reagierten 2,1 % der T-Zellen in Spender 2 mit einer IFN- γ Produktion auf die Stimulation mit dem Antigen. In Spender 3 waren es 0,8 %. Moser et al. 2009 hatten Versuche mit dem bereits auf dem Markt erhältlichen YF-VAX Gelbfieberimpfstoff unternommen. Sie hatten Zellen für 2 Wochen in einer DCs/T-Zell-Kokultur mit dem Impfstoff inkubiert und anschließend mittels ELISPOT den Anteil an IFN γ produzierenden T-Zellen ermittelt. 4 Spender waren untersucht worden. Die höchsten Rate an IFN- γ produzierenden Zellen lag hier nur bei 0,85 %. Beim Priming gegen M-VLPs zeigte sich für Spender 2 eine hohe Hintergrundaktivität, so dass die Stimulation nur knapp über dem Niveau der Negativkontrolle lag. Für Spender 3 zeigte sich eine deutliche Interferonantwort der stimulierten T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle.

Der Rezeptor CD154 ist spezifisch für aktivierte T-Zellen. Es war deshalb auch eine Färbung dieses Rezeptors mittels fluoreszierender Antikörper durchgeführt worden. Der Rezeptor wird nur für kurze Zeit auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion von CD154 auf T-Zellen und dem Gegenspieler CD40 auf einer APC wird der Rezeptor nach der Interaktion schnell internalisiert und abgebaut [16]. Hier wurde den Zellen deshalb Brefeldin A zugesetzt, dass einen Transport des Rezeptors an die Oberfläche verhindert. Der Rezeptor wurde dann mit einer intrazellulären Färbung gefärbt [33]. Es bestand die Erwartung, dass die IFN- γ^+ T-Zellen als Ausdruck ihrer Aktivierung auch den Rezeptor exprimieren würden. Jedoch konnte für die Färbung mit dem CD154 AK keine Fluoreszenz über dem Niveau der Negativkontrolle in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Weitere Experimente sollten sich zur Optimierung der Färbemethode anschließen. Zudem könnten die Versuche mit mehr Spendern wiederholt werden. Dabei könnte auch untersucht

werden, inwieweit weitere T-Helferzellsubgruppen durch die Kokultur aktiviert werden können. Hilfreich wäre hierbei eine Färbung verschiedener weiterer Leitzytokine : Th2 (IL-5) Th17 (IL-17) und TFH (IL-21). Eine Antwort aller Subtypen ist dabei wichtig für eine effektive adaptive Immunantwort gegen ein Pathogen [83].

7.9. Zusammenfassung

Trotz eines erheblichen Forschungsaufwandes ist es in den letzten 30 Jahren nicht gelungen, einen prophylaktischen Impfstoff gegen HIV zu entwickeln. Unter Umständen muss von der Idee Abstand genommen werden, eine HIV-Vakzine nach dem Modell bisher erfolgreicher viraler Vakzine entwickeln zu können, da herkömmliche Mechanismen zur Immunabwehr viraler Erkrankungen im Falle von HIV nicht funktionieren. Um mögliche Ansätze genauer zu untersuchen, bedarf es fundamentaler Grundlagenforschung. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, eine Methode zu etablieren, um die T-Zellimmunogenität potentielle Impfstoffkandidaten an primären T-Zellen in vitro zu testen. Als Vakzinekandidaten dienten Virus like particles (VLPs) die in Säugetier- und Insektenzellen produziert wurden.

Da die T-Helferzellantwort auf die effektive Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen (DCs) angewiesen ist, wurde zunächst die Aufnahme von VLPs in DCs mit verschiedenen Methoden untersucht. VLPs wurden mit CFDA gefärbt und die Aufnahme in DCs nach 4 Stunden mittels Durchflusszytomtrie gemessen. Des Weiteren wurde das Gag-Gen an eine Sequenz für das Green-flourescent protein (GFP) gekoppelt und in einen DNA-Vektor eingebracht, der an menschlichen embryonalen Nierenzellen ausgetestet wurde. Es zeigte sich eine erfolgreiche Expression des Gag-GFP Genproduktes nach 4 bzw. 5 Tagen.

Anschließend wurde ein bereits bestehendes Verfahren zur Prägung naiver T-Zellen in vitro modifiziert und genutzt, um naive T-Zellen mit Hilfe von DCs gegen VLPs zu prägen und zu Th1 Zellen zu differenzieren. Nach 14 Tagen einer Kokultur erfolgte eine Restimulation der T-Zellen. Als Ausdruck einer Differenzierung der naiven T-

Zellen zu reifen Th1 Zellen diente die Produktion des Zytokins IFN- γ dessen Produktion innerhalb der T-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Für 2 der 3 Spender konnte eine erfolgreiche Kultur über 14 Tage erfolgen. In beiden Spendern lag nach Stimulation der Anteil IFN- γ produzierender T-Zellen hochsignifikant über dem Niveau der unstimulierten Negativkontrollen. Es konnten demnach naive T-Zellen HIV-negativer Spender erfolgreich in vitro gegen VLPs geprägt, und zu Th1 Zellen differenziert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Wolff J. A., R. W. Malone, and P. Williams. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247:1465 – 1468, 1190.
- [2] Michael E. Abram, Andrea L. Ferris, Wei Shao, W. Gregory Alvord, and Stephen H. Hughes. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J. Virol.*, 84(19):9864–9878, October 2010.
- [3] H. J. Alter, Eichberg J. W., H. Masur, W. C. Saxinger, R Gallo, A. M. Macher, H. C. Lane, and A. S. Fauci. Transmission of htlv-iii infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for aids. *Science (New York, N.Y.)*, 226:549–552, 1984.
- [4] P. Auewarakul, V. Paungcharoen, Louisirirochanakul S., and Wasi C. Application of hiv-1-green fluorescent protein (gfp) reporter viruses in neutralizing antibody assays. *Asian Pac J Allergy Immunol*, :139-44., 2001.
- [5] Jacques Banchereau and Ralph M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392:254–252, 1998.
- [6] Dan H. Barouch. Challenges in the development of an hiv-1 vaccine. *nature*, 2008.
- [7] Dan H. Barouch and Norman L. Letvin. Viral evolution and challenges in the development of HIV vaccines. *Vaccine*, 20(Supplement 4):A66–A68, December 2002.
- [8] F. Barre-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, D. Dauguet, C. Axler-Blin, F Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. Isolation of a t-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599):868 –871, may 1983.

- [9] Paul D. Bieniasz. The cell biology of hiv-1 virion genesis. *Cell Host & Microbe*, Volume 5:550–558, 2009.
- [10] Alexandra Bojak, Ludwig Deml, and Ralf Wagner. The past, present and future of HIV-vaccine development: a critical view. *Drug Discovery Today*, 7(1):36–46, January 2002.
- [11] James F. Braun. The gastrointestinal tract in hiv-1 infection: Questions, answers, and more questions! *Physician's research network*, 12:1–10, 2007.
- [12] Susan P Buchbinder, Devan V Mehrotra, Ann Duerr, Daniel W Fitzgerald, Robin Mogg, David Li, Peter B Gilbert, Javier R Lama, Michael Marmor, Carlos del Rio, M Juliana McElrath, Danilo R Casimiro, Keith M Gottesdiener, Jeffrey A Chodakewitz, Lawrence Corey, and Michael N Robertson. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity hiv-1 vaccine (the step study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *The Lancet*, 372(9653):1881–1893, November 2008.
- [13] L. Buonaguro, M. L. Tornesello, M. Tagliamonte, R. C. Gallo, L. X. Wang, R. Kamin-Lewis, S. Abdelwahab, G. K. Lewis, and F. M. Buonaguro. Baculovirus-Derived human immunodeficiency virus type 1 Virus-Like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-Cell responses. *J. Virol.*, 80(18):9134–9143, September 2006.
- [14] Victor Buzon, Ganesh Natrajan, David Schibli, Felix Campelo, Michael M. Kozlov, and Winfried Weissenhorn. Crystal structure of HIV-1 gp41 including both fusion peptide and membrane proximal external regions. *PLoS Pathog*, 6(5):e1000880, May 2010.
- [15] Mark Walport J.Donald Capra Charles A. Janeway, Paul Travers. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science, 2011.
- [16] Pratip K Chattopadhyay, Joanne Yu, and Mario Roederer. Live-cell assay to

detect antigen-specific cd4+t-cell responses by cd154 expression. *npg*, 1:1–6, 2006.

- [17] Rittik Chaudhuri, O. Wolf Lindwasser, William J. Smith, James H. Hurley, and Juan S. Bonifacino. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of nef with the AP2 clathrin adaptor. *J. Virol.*, 81(8):3877–3890, April 2007.
- [18] Bing Chen, Erik M. Vogan, Haiyun Gong, John J. Skehel, Don C. Wiley, and Stephen C. Harrison. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature*, 433(7028):834–841, February 2005.
- [19] Andrew B. Cubitt, Roger Heim, Stephen R. Adams, Aileen E. Boyd, Larry A. Gross, and Roger Y. Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(11):448–455, November 1995.
- [20] B. M. Dale, McNerney G. P., W. Huebner, T. R. Huser, and B. K. Chen. Tracking and quantitation of fluorescent hiv during cell-to-cell transmission. *Methods*, 53:20–26, 2010.
- [21] Ludwig Deml, Reinhold Schirmbeck, Jörg Reimann, Hans Wolf, and Ralf Wagner. Recombinant human immunodeficiency pr55gagvirus-like particles presenting chimeric envelope glycoproteins induce cytotoxic t-cells and neutralizing antibodies. *Virology*, 235(1):26 – 39, 1997.
- [22] Cynthia A Derdeyn and Guido Silvestri. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Current Opinion in Immunology*, 17(4):366–373, August 2005.
- [23] Linh X. Doan, Min Li, Changyi Chen, and Qizhi Yao. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Reviews in Medical Virology*, 15(2):75–88, 2005.
- [24] Raphael Dolin. Hiv vaccine trial results , an opening for further research. *New England Journal of Medicine*, 361(23):2279–2280, 2009.

- [25] Miroslav Dundr, James G McNally, Jean Cohen, and Tom Misteli. Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. *J. Struct. Biol.*, 140(1-3):92–99, December 2002. PMID: 12490157.
- [26] David T. Durack. Opportunistic infections and kaposi's sarcoma in homosexual men. *New England Journal of Medicine*, 305(24):1465–1467, 1981.
- [27] Theodora Hatzioannou & David T. Evans. Animal models for hiv/aids research. *Nature*, 10:852–867, 2012.
- [28] Anthony S. Fauci. 25 years of HIV. *Nature*, 453(7193):289–290, May 2008.
- [29] K. Fernando. Vaccine-delivered hiv envelope inhibits cd4+ t-cell activation, a mechanism for poor hiv vaccine responses. *Blood*, 109:2538–2544., 2007.
- [30] Kathy Fernando, Haitao Hu, Houping Ni, James A. Hoxie, and Drew Weissman. Vaccine-delivered HIV envelope inhibits CD4+ t-cell activation, a mechanism for poor HIV vaccine responses. *Blood*, 109(6):2538 – 2544, March 2007. PMID: 17158230 PMCID: PMC1852208.
- [31] Harro CD Judson FN Mayer KH Para MF; rgp120 HIV Vaccine Study Group. Flynn NM, Forthal DN. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent hiv-1 infection. *Journal of infectious disease*, 191:654–665, 2005.
- [32] Eric O. Freed. Hiv-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 26:13–33, 2001. 10.1023/A:1021070512287.
- [33] Marco Frentsch, Olga Arbach, Dennis Kirchhoff, Beate Moewes, Margitta Worm, Martin Rothe, Alexander Scheffold, and Andreas Thiel. Direct access to CD4+ t cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med*, 11(10):1118–1124, October 2005.
- [34] T Geijtenbeek. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-Binding protein that enhances trans-Infection of t cells. *Cell*, 100(5):587–597, 2000.

- [35] Alain Gervais, Daniel West, Lorenzo M. Leoni, Douglas D. Richman, Flossie Wong-Staal, and Jacques Corbeil. A new reporter cell line to monitor hiv infection and drug susceptibility in-vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 1997.
- [36] Dirk Gheysen, Eric Jacobs, Francoise de Foresta, Clotilde Thiriart, Myriam Francotte, Denise Thines, and Michel De Wilde. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*, 59(1):103–112, October 1989.
- [37] Peter B Gilbert, Ian W McKeague, Geoffrey Eisen, Christopher Mullins, Aissatou Guéye-NDiaye, Souleymane Mboup, and Phyllis J Kanki. Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in senegal. *Statistics in medicine*, 22(4):573–593, February 2003. PMID: 12590415.
- [38] Nilu Goonetilleke, Michael K.P. Liu, Jesus F. Salazar-Gonzalez, Guido Ferrari, Elena Giorgi, Vitaly V. Ganusov, Brandon F. Keele, Gerald H. Learn, Emma L. Turnbull, Maria G. Salazar, Kent J. Weinhold, Stephen Moore, CHAVI Clinical Core B, Norman Letvin, Barton F. Haynes, Myron S. Cohen, Peter Hrabec, Tanmoy Bhattacharya, Persephone Borrow, Alan S. Perelson, Beatrice H. Hahn, George M. Shaw, Bette T. Korber, and Andrew J. McMichael. The first t cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in hiv-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(6):1253–1272, 2009.
- [39] Glenda Gray, Susan Buchbinder, and Ann Duerr. Overview of STEP and phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype b HIV vaccine. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(5):357–361, 2010.
- [40] Thomas Harrer. *HIV-Buch 2010*, chapter Präventive HIV-1-Impfung: Aktueller Stand. Medizin Fokus Verlag, Hamburg, 2010.

- [41] John Hiscott, Hakju Kwon, and Pierre Génin. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF- κ B pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 107(2):143–151, January 2001. PMID: 11160127 PMCID: 199181.
- [42] Johns Hopkins. Use of a macrophage-tropic gfp-tagged human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) to study viral reservoirs. *Methods Mol Biol.*, 515, 2009.
- [43] Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, and J. Donald Capra. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Churchill Livingstone, 4th edition, March 1999.
- [44] Donald L. Jarvis and Eric E. Finn. Biochemical analysis of the n-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology*, 212(2):500 – 511, 1995.
- [45] Christian Jassoy and Ralf Wagner. Perspektiven fuer die entwicklung einer hiv-vakzine. *Dtsch Arztebl*, 28-29:1962–1971, 2002.
- [46] Margaret I. Johnston. An hiv vaccine-challenges and prospects. *The New England Journal of Medicine*, 2008.
- [47] Albert Jordan, Patricia Defechereux, and Eric Verdin. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to tat transactivation. *EMBO J*, 20(7):1726–1738, April 2001.
- [48] Kelvin P. Lee Bruce L. Levine Katia Schlienger, Nancy Craighead and Carl H. June. Efficient priming of protein antigen-specific human cd4+ t cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 96:3490–3498, 2000.
- [49] M Kryworuchko, V Pasquier, and J Theze. Human immunodeficiency virus-1 envelope glycoproteins and anti-CD4 antibodies inhibit interleukin-2-induced Jak/STAT signalling in human CD4 t lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 131(3):422–427, March 2003. PMID: 12605694 PMCID: PMC1808643.

- [50] Peter D. Kwong, Michael L. Doyle, David J. Casper, Claudia Cicala, Stephanie A. Leavitt, Shahzad Majeed, Tavis D. Steenbeke, Miro Venturi, Irwin Chaiken, Michael Fung, Hermann Katinger, Paul W. I. H. Parren, James Robinson, Donald Van Ryk, Liping Wang, Dennis R. Burton, Ernesto Freire, Richard Wyatt, Joseph Sodroski, Wayne A. Hendrickson, and James Arthos. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*, 420(6916):678–682, December 2002.
- [51] Karin Loré, Anna Smed-Soerens, Jayanand Vasudevan, John R. Mascola, and Richard A. Koup. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4⁺ t cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(12):2023 –2033, June 2005.
- [52] Christine Ludwig and Ralf Wagner. Virus-like particles - universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6):537 – 545, 2007.
- [53] Qiangzhong Ma, Yawen Wang, Agnes Shuk-Yee Lo, Erica M Gomes, and Richard P Junghans. Cell density plays a critical role in ex vivo expansion of t cells for adoptive immunotherapy. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010:386545, 2010. PMID: 20625484.
- [54] Ulrich Mahlknecht, Cheng Deng², Michael C. Lu, Thomas C. Greenough, John L. Sullivan, William A. O'Brien, and Georges Herbein. Resistance to apoptosis in hiv-infected cd4⁺ t lymphocytes is mediated by macrophages: Role for nef and immune activation in viral persistence. *Journal of Immunology*, 165, 2000.
- [55] J. R. Mascola and et al. Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group*, 173:340–348, 1996.
- [56] David McDonald, Marie A. Vodicka, Ginger Lucero, Tatyana M. Svitkina, Gary G.

Borisy, Michael Emerman, and Thomas J. Hope. Visualization of the intracellular behavior of hiv in living cells. *JCB*, 159:441–452, 2002.

- [57] Under Secretary-General of the United Nations Michel Sidibé, UNAIDS Executive Director. Unaid report on the global aids epidemic| 2012. 2012.
- [58] Roger H. Miller and Nava Sarver. Hiv accessory proteins as therapeutic targets. *Nat Med*, 3(4):389–394, April 1997.
- [59] Alessandra Mortellaro and Paola Ricciardi-Castagnoli. From vaccine practice to vaccine science: the contribution of human immunology to the prevention of infectious disease. *Immunol Cell Biol*, 89(3):332–339, March 2011.
- [60] Janice M. Moser, Emily R. Sassano, Del C. Leistritz, Jennifer M. Eatrides, Sanjay Phogat, Wayne Koff, and Donald R. Drake III. Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naive human cd4+ t cells. *Journal of Immunological Methods*, 353(1-2):8 – 19, 2010.
- [61] Peter A. Newman, Sung-Jae Lee, Naihua Duan, Ellen Rudy, Terry K. Nakazono, John Boscardin, Lisa Kakinami, Steven Shoptaw, Allison Diamant, and William E. Cunningham. Preventive HIV vaccine acceptability and behavioral risk compensation among a random sample of high-risk adults in los angeles (L.A. VOICES). *Health services research*, 44(6):2167–2179, December 2009. PMID: 19780857 PMCID: 2796320.
- [62] Sebastien Nisole and Ali Saib. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*, 1(1):9, 2004.
- [63] N Oyaizu, N Chirmule, V S Kalyanaraman, W W Hall, R Pahwa, M Shuster, and S Pahwa. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 produces immune defects in CD4+ t lymphocytes by inhibiting interleukin 2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(6):2379–2383, March 1990. PMID: 2315327.

- [64] Xavier Paliard, Yuan Liu, Ralf Wagner, Hans Wolf, Juergen Baenziger, and Christopher M. Walker. Priming of strong, broad, and long-lived hiv type 1 p55 gag-specific cd8 1cytotoxic t cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *Aids Research and Human Retroviruses*, 16:273 – 282, 2000.
- [65] Gang Peng, Ke Jian Lei, Wenwen Jin, Teresa Greenwell-Wild, and Sharon M. Wahl. Induction of APOBEC3 family proteins, a defensive maneuver underlying interferon-induced anti-HIV-1 activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(1):41 –46, January 2006.
- [66] P. Pitisuttithum, P. Gilbert, M. Gurwith, W. Heyward, M. Martin, F. van Griensven, D. Hu, J. W. Tappero, K. Choopanya, and Bangkok Vaccine Evaluation Group. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 hiv-1 vaccine among injection drug users in bangkok, thailand. *The Journal of infectious disease*, 194:1661–1671, 2006.
- [67] Punnee Pitisuttithum, Peter Gilbert, Marc Gurwith, William Heyward, Michael Martin, Fritz van Griensven, Dale Hu, Jordan W. Tappero, and Kachit Choopanya for the Bangkok Vaccine Evaluation Group. Page 1 trial of rgp120 hiv-1 vaccine among idus · jid 2006:194 (15 december) · 1661 major article randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 hiv-1 vaccine among injection drug users in bangkok, thailand. *The Journal of Infectious Diseases*, 2006.
- [68] Victoria W. Pollard and Michael H. Malim. THE HIV-1 REV PROTEIN. *Annual Review of Microbiology*, 52(1):491–532, 1998.
- [69] Serguei Popov, Michael Rexach, Gabriele Zybarth, Norbert Reiling, May-Ann Lee, Lee Ratner, Cynthia M. Lane, Mary Shannon Moore, Gunter Blobel, and Michael Bukrinsky. Viral protein r regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J*, 17(4):909–917, February 1998.

- [70] B. Preston, B. Poiesz, and L. Loeb. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. 242(4882):1168–1171, November 1988.
- [71] F. H. Priddy, D. Brown, J. Kublin, K. Monahan, D. P. Wright, J. Lalezari, S. Santiago, M. Marmor, M. Lally, R. M. Novak, S. J. Brown, P. Kulkarni, S.A. Dubey, L. S. Kierstead, D. R. Casimiro, R. Mogg, M. J. DiNubile, J. W. Shiver, R. Y. Leavitt, M. N. Robertson, D. V. Mehrotra, E Quirk, and Merck V520-016 Study Group. Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 hiv-1 clade b gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clinical infectious disease*, 46:1769–81, 2008.
- [72] J. D. Reeves and R. W. Doms. Human immunodeficiency virus type 2. *The Journal of general virology*, 83(Pt 6):1253–1265, June 2002. PMID: 12029140.
- [73] Hofmann-Lehmann Reginaa, Vlasak Josefa, Williams Alison, Chenine Agnes-Laurencea, McClure Harold, Anderson Daniel, O’Neil Shawn, and Ruprecht Ruth. Live attenuated, nef-deleted SIV is pathogenic in most adult macaques after prolonged observation. *AIDS*, 17, 2003.
- [74] Supachai Rerks-Ngarm, Punnee Pitisuttithum, Sorachai Nitayaphan, Jaranit Kaewkungwal, Joseph Chiu, Robert Paris, Nakorn Premisri, Chawetsan Namwat, Mark de Souza, Elizabeth Adams, Michael Benenson, Sanjay Gurunathan, Jim Tartaglia, John G. McNeil, Donald P. Francis, Donald Stablein, Deborah L. Birx, Supamit Chunsuttiwat, Chirasak Khamboonruang, Prasert Thongcharoen, Merlin L. Robb, Nelson L. Michael, Prayura Kunasol, and Jerome H. Kim. Vaccination with alvac and aidsvac to prevent hiv-1 infection in thailand. *New England Journal of Medicine*, 361(23):2209–2220, 2009.
- [75] The rgp120 HIV Vaccine Study Group. Placebo controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent hiv 1 infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(5):654–665, 2005.

- [76] Merlin L Robb. Failure of the merck hiv vaccine: an uncertain step forward. *The Lancet*, 372(9653):1857–1858, November 2008.
- [77] Jürgen Rockstroh. *HIV 2010*, chapter Einleitung, pages 2–12. Medizin Fokus Verlag, 2010.
- [78] E. Rollman, A. Brave, A. Boberg, L. Gudmundsdotter, G. Engstroem, M. Isagulians, K. Ljungberg, B. Lundgren, P. Blomberg, J. Hinkula, B. Hejdeman, E. Sandstroem, M. Liu, and B. Wahren. The rationale behind a vaccine based on multiple HIV antigens. *Microbes and Infection*, 7(14):1414–1423, November 2005.
- [79] Sayuri Sakuragi, Toshiyuki Goto, Kouichi Sano, and Yuko Morikawa. HIV type 1 gag virus-like particle budding from spheroplasts of *saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12):7956 –7961, June 2002.
- [80] Stephanie Sandefur, Rita M. Smith, Vasundhara Varthakavi, and Paul Spearman. Mapping and characterization of the N-Terminal i domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J. Virol.*, 74(16):7238–7249, August 2000.
- [81] 1. Q J Sattentau and 2. J P Moore. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble cd4 binding. *JEM*, 1991.
- [82] Thomas F. Schulz. *Humane Immundefizienz-Viren (HIV-1, HIV-2)*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, 2009. 10.1007/978-3-540-46362-7_67.
- [83] Denis Gaucher René Therrien Nadia Kettaf Bastian R. Angermann Genevieve Boucher Abdelali Filali-Mouhim Janice M. Moser Riyaz S. Mehta Donald R. Drake III Erika Castro Rama Akondy Aline Rinfret Bader Yassine-Diab Elias A. Said Younes Chouikh Mark J. Cameron Robert Clum David Kelvin Roland Somogyi Larry D. Greller Robert S. Balderas Peter Wilkinson Giuseppe Pantaleo

Jim Tartaglia Elias K. Haddad Rafick-Pierre Sékaly. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *JEM*, 205 no. 13:3119–3131, 2008.

- [84] Saleta Sierra, Bernd Kupfer, and Rolf Kaiser. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*, 34(4):233–244, December 2005.
- [85] M. Thomas, J. J. Lu, Q. Ge, C. Zhang, J. Chen, and A. M. Klibanov. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *PNAS*, 112(16):5679 – 5684, 2005.
- [86] Angela M. Thornton and Ethan M. Shevach. CD4+CD25+ immunoregulatory t cells suppress polyclonal t cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188(2):287–296, July 1998.
- [87] Andrea Rubbert-Roth und Georg Behrens. *HIV-Buch 2010*, chapter Pathophysiologie der HIV-Infektion. Medizin Fokus Verlag, Hamburg, 2010.
- [88] David I. Watkins, Dennis R. Burton, Esper G. Kallas, John P. Moore, and Wayne C. Koff. Nonhuman primate models and the failure of the merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med*, 14(6):617–621, June 2008.
- [89] Cone R Luethy R Moelling K Weber R, Bossart W. Phase i clinical trial with hiv-1 gp160 plasmid vaccine in hiv-1-infected asymptomatic subjects. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20:800 – 803, 2001.
- [90] Kelly R. Young, Sean P. McBurney, Lukena U. Karkhanis, and Ted M. Ross. Virus-like particles: Designing an effective aids vaccine. *Methods*, 40(1):98 – 117, 2006. Particle-based Vaccines.

A. Anhang

A.1. Codonoptimierte Sequenzen für das GFP-gag-Gen

IIIB Gag (codon optimiert)

```
atgggcgccagggccagcgtgctgagcggcgaggctggacaggtgggagaagatcagg 60
ctgaggcccgcggaagaagaagtataagctgaagcacatcgtgtgggcccagcaggag 120
ctggagagggttcgcccgtgaacccccggcctgctggagaccagcagggtgctcaggcagatc 180
ctgggcccagctgcagcccagcctgcagaccggcagcagaggagctgaggagcctgtacaac 240
accgtggccaccctgtactgctgcaccagaggatcgagatcaaggacaccaaggaggcc 300
ctggacaagatcgaggaggagcagaacaagtccaagaagaaggcccagcaggccgcccgc 360
gacaccggccacagcagccaggtgagccagaactaccccatcgtgcagaacatccagggc 420
cagatggtgacaccaggccatcagccccaggaccctgaacgcctgggtgaaggtggtggag 480
gagaaggccttcagccccgaggtgatccccatgttcagcgcctgagcagggagccacc 540
ccccaggacctgaacaccatgctgaacaccgtggcgccaccaggccgcatgcagatg 600
ctgaaggagaccatcaacgaggagcgcccgagtgggacagggtgcaccccgctgcacgcc 660
ggccccatcgccccggccagatgaggagcccccgcggcagcgacatcgccggcaccacc 720
agcaccctgcaggagcagatcggtggatgaccaacaaccccccatccccgtggcgaa 780
atctacaagaggtggtatcatcctgggcctgaacaagatcgtgaggatgtacagccccacc 840
agcatcctggatatcaggcagggcccccagagcccttcagggaactacgtggacaggttc 900
tacaagaccctgcgcgcccagcagccagccaggaggtgaagaactggatgaccgagacc 960
ctgctggtgcagaacgccaacccccgactgcaagaccatcctgaaggccctgggacccgcc 1020
gccaccctggaggagatgatgaccgcctgccagggcgtggcgcccccggccacaaggcc 1080
agggtgctggccgagggccatgagccaggtgaccaacaccgcccaccatcatgatgcagagg 1140
ggcaacttcagggaaccagagggaagatggtgaagtgttcaactgcggcaaggaggccac 1200
accgccaggaactgcgcgccccaggaagaagggtgctggaagtgcggcaaggagggtc 1260
caccagatgaaggactgcaccgagaggcaggccaacttcctgggcaagatctggcccagc 1320
tacaagggcaggccccgcaacttcctgcagagcaggccccgagcccaccgcccccccttc 1380
ctgcagagcaggccccgagcccaccgcccccccgaggagagcttcaggagcggcgtggag 1440
accaccaccctcctcagaagcaggagcccatcgacaaggagctgtacccctgaccagc 1500
ctgaggagcctgttcggcaacgaccccgagcagccagtga 1539
```

```
MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQI 60
LGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAAA 120
DTGHSSQVSQNYPIVQNIQGMVHQAISPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGAT 180
PQDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTT 240
STLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWII LGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF 300
YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
RVLAEMSQVTNTATIMMQRGNFRNQRKMKVCFNCGKEGHTARNCRAPRKKGCWKCGKEG 420
HQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQSRPEPTAPPFLQSRPEPTAPPEESFRSGVE 480
TTTPPKQKEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ. 513
```

ZM96 Gag (codon optimiert)

```
atgggagccagagccagcatcctgagaggcggaagctggacaagtgggagaagatccgg 60
ctgagacctggcggaagaacggtacatgatcaagcacctggtgtgggcttctcgaggag 120
```

ctggaaagattcgccctgaatcccgccctgctggaaaccagcgagggtgcaagcagatc 180
 atgaagcagctgcagcctgcccctgcagaccggcaccgaggaactgcggagcctgtacaac 240
 accgtggccaccctgtactgctgcagcagggcgctggaagtgcgggacaccaaagaggcc 300
 ctggaccggatcgaggaagaacagaacaagatccagcagaagattcagcagaaaaccag 360
 caggctgccgacggcaaggtgtcccagaactaccccatcgtgcagaacctgcagggccag 420
 atggtgcaccagaagctgtcacctcggaccctgaacgcctgggtgaaagtgatcgaggaa 480
 aaggccttcagccctgaagtgtacccatgttcacagccctgagcgaggagccacaccc 540
 caggacctgaacaccatgctgaacaccgtgggagggcaccaggctgcatgcagatgctg 600
 aaggacacccatcaacgaagaggctgccagtgaggaccggctgcaccctgtccatgctgga 660
 cctattgcccctggccagatgcgggagccagaggctccgatattgccggcaccacctcc 720
 aactgcaagaacagatcgccctggatgaccagcaaccctcccatccccgtgggacacatc 780
 tacaagcgggtgatcatcctgggcctgaacaagatcgtgcggatgtacagccctgtgtcc 840
 atcctggacatcaagcagggaacccaagagcccttcgggactacgtggaccggttcttc 900
 aagacctgagagccgagcaggccaccgaagaggtgaagaactggatgaccgacaccctg 960
 ctggtgcagaacgccaaacccgactgcaagaccatcctgaaggccctgggacctggagcc 1020
 accctggaagagatgatgaccgcctgccaggcgctgggaggagccagccacaaggctcgg 1080
 gtgctggccgaggccatgagccagaccaacagcgtgaacatcctgatgcagaagtccaac 1140
 ttcaagggaacaagcggatggtgaagtgttcaactgtggaaaggaggccacattgcc 1200
 agaaactgcagagcccaagaaaaagggtgctggaagtgcggcaagaggggcaccag 1260
 atgaaggactgcaccgagcggcaggctaacttctgggcaagatctggccctcccacaag 1320
 ggcagaccaggcaacttctgcaaacagaccgagccaacagccctcctgccgagagc 1380
 ttcagattcgaggaaaccacccctgccccaaagcaggaaagcaaggaccgggagccctg 1440
 acctcctgaagtcctgttcggcagcgacccctgagccagtga 1485

MGARASILRGKGLDKWEKIRLRPGGKKRYMIKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQI 60
 MKQLQPALQTGTEELRSLYNTVATLYCVHEGVEVRDTKEALDRIEEENKIQKIQKTQ 120
 QAADGKVSQNYPIVQNLQGMVHQKLSRPTLNWVKVIEEKAFSPEVIPMFTALSEGATP 180
 QDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLEHVPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTS 240
 TLQEQAIAWMTSNPPIPVGDIYKRWIIILGLNKIVRMYSPVSILDIKQGPKEPFRDYVDRFF 300
 KTLRAEQATQEVKNWMTDTLLVQNANPDCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKAR 360
 VLAEAMSTNSVNILMQKSNFKGNKRMVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQ 420
 MKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQNRPEPTAPPAESFRFEETTPAPKQESKDREAL 480
 TSLKSLFGSDPLSQ. 495

IIIB_GFP (codon optimiert)

atgggcccagagcctctgtgctgtctggcggcgagctggacagatgggagaagatccgg 60
 ctgcccagaggcggcaagaagaagtacaagctgaagcacatcgtgtggccagcagagag 120
 ctggaaagattcgccctgaaccccgactgctggaaaccagcgagggtgcagacagatc 180
 ctgggccagctgcagcccagcctgcagacaggcagcgaggaactgcggagcctgtacaac 240
 accgtggccaccctgtactgctgcaccagcggatcgagatcaaggacaccaaagaggcc 300
 ctggacaagatcgaggaagaacagaacaagtccaagaagaaggccagcaggccgctgcc 360
 gacacaggccacagcagccaggtgtcccagaactaccccatcgtgcagaacatccaggga 420
 cagatggtgcaccaggccatctctccccggaccctgaacgcctgggtgaaagtgggtgaa 480
 gagaaggccttcagtcgggaagtgtacccatgttcagcgcctgagcgaggcgccacc 540
 cccaggaacctgaacacatgctgaacaccgtggcgagacatcaggccgcatgcagatg 600
 ctgaaagagacaatcaacgaagaggccgagtgaggacagagtgacccagtcacgcc 660
 ggacctattgcccctggccagatgagagagccagaggcagcgatatcgccggcaccacc 720
 tccacctgcaagaacagatcggtggatgaccaacaaccccccatccccgtggcgag 780
 atctacaagcgggtgatcatcctgggcctgaacaagatcgtgcggatgtacagccccacc 840
 agcatcctggacatcagacaggggcccaagagcccttcgggactacgtggaccggttc 900
 tacaagacctgcccggcgagcaggccagccaagaagtgaagaactggatgaccgagaca 960
 ctgctggtgcagaacgccaaacccgactgcaagaccatcctgaaggccctgggcccctgcc 1020
 gccacctggaagagatgatgaccgcctgccaggcgctggcgagacctggacacaaagcc 1080

agagtgtgctggccgagggccatgagccaggtgacaaacaccgccacaatcatgatgcagcgg 1140
 ggcaacttcggaaccagcggaagatggtgaaatgcttcaactgcggcaaagagggccac 1200
 accgcccgaactgcagagccccagaaagaaaggctgctggaagtgcggaaaagaagga 1260
 caccagatgaaggactgcaccgagcggcaggccaacttcctgggcaagatctggccctcc 1320
 tacaagggcagaccggcaacttcctgcagagcagaccgagcctaccgccccacccttc 1380
 ctgcagtccaggcctgagcccacagccccccctgaggaaagcttccgcagcggcgtggaa 1440
 accaccacccccccacagaagcaggaacccatcgacaaagagctgtacccctgaccagc 1500
 ctgagaagcctgttccggaacgaccccagctccagatggtgtccaagggggaggaactg 1560
 ttcaccggcgtggtgcccacatcctggtggaactggacggcgacgtgaacggccacaagt 1620
 agcgtgtccggcgaggggcgagggggatgccacctacggcaagctgacctgaagtccatc 1680
 tgcaccaccggcaagctgcccgtgcccctggcctaccctggtgacaaccttcacctacggc 1740
 gtgcagtgtcttcagcagataccccgaccacatgaagcagcagatttcttcaagagcggc 1800
 atgcctgagggctacgtgcaggaacggaccatcttcttcaaggacgacggcaactacaag 1860
 accagagccgaagtgaagtctgagggcgacacctggtgaaccggatcgagctgaagggc 1920
 atcgacttcaaagaggacggcaatatcctgggacacaagctggagtacaactacaacagc 1980
 cacaacgtgtacatcatggccgacaaagcagaaaaacggcatcaaagtgaacttcaagatc 2040
 cggcacaacatcgaggacggcagcgtgcagctggccgaccactaccagcagaacaccccc 2100
 atcgggcgacggccccgtgctgctgcccgcacaatcactacctgagcaccagagcgccctg 2160
 tccaaggaccccaacgagaagcgggaccacatggtgctgctggaattcgtgaccgccgt 2220
 ggcatcacctgggcatggacgagctgtacaagtga 2256

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQI 60
 LGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNSKKKAQAAAA 120
 DTGHSSQVSQNYPIVQNIQGMVHQAIISPRTLNAWVKVVEEKAFSPVEIPMFSALSEGAT 180
 PQDLNMTLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDVRVHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTT 240
 STLQEQIGWMTNPNPIPVEIYKRWIILGLNKIVRMYSPSILDIRQGPKEPFRDYVDRF 300
 YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNPDPCKTILKALGPAATLEEMMTACQVGGPGHKA 360
 RVLAEAMSQVTNTATIMMRGNFRNRKMKVCFNCGKEGHTARNCRAPRKKGCWKCGKEG 420
 HQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQSRPEPTAPPFLQSRPEPTAPPEESFRSGVE 480
 TTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKF 540
 SVSGEGEDATYGLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSA 600
 MPEGVVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYS 660
 HNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSAL 720
 SKDPNEKRDMVLLEFVTAAGITLGMDELYK. 752

ZM96_GFP (codon optimiert)

atgggcccagagcctctatcctgagaggcggcaagctggacaagtgggagaagatccgg 60
 ctgcccgtggcggcaagaaacggtacatgatcaagcacctggtgtgggcccagcagagag 120
 ctggaagattcgccctgaaccccgactgctggaaaccagcgagggtgcaagcagatc 180
 atgaagcagctgcagcccgcctgcagaccggcaccgaggaactgcggagcctgtacaac 240
 accgtggccaccctgtactgctgcacgagggcgtggaagtgcgggacaccaaagaggcc 300
 ctggaccggatcgaggaagaacagaacaagatccagcagaagattcagcagaaaaccag 360
 caggctgccgacggcaaggtgtccagaactaccccatcgtgcagaacctgcagggccag 420
 atggtgcaccagaagtgcagccccggaccctgaacgcctgggtgaaagtgatcgaggaa 480
 aaggccttcagccccgaagtgatcccatgttcaccgccctgagcgaggcgccacacc 540
 caggacctgaacaccatgctgaacaccgtggcgccaccaggcccatgcagatgctg 600
 aaggacaccatcaacgaagaggccgccgagtgggaccggctgcatcctgtgcacgccgga 660
 cctatcgccctggccagatgagagagcccagaggcagcgatatcgccggcaccaccagc 720
 accctgcaagaacagatcgccctggtgaccagcaaccccccatccccgtgggcgacatc 780
 tacaagcgttgatcatcctgggcctgaacaagatcgtgcggatgtacagccccgtgtcc 840
 atcctggacatcaagcaggcccccaagagcccttcgggactacgtggaccggttcttc 900
 aagacctgcgggcccagcaggccaccaagaagtgaagaactggatgaccgacaccctg 960
 ctggtgcagaacgccaccccgactgcaagaccatcctgaaggccctgggacctggcgcc 1020
 accctggaagagatgatgaccgcctgccaggcgctggcgccgaccttctcacaaggccaga 1080

gtgctggccgaggccatgagccagaccaacagcgtgaacatcctgatgcagaagtccaac 1140
 ttcaagggcaacaagcggatggtgaaatgcttcaactgcggcaaagagggccacattgcc 1200
 cggaactgcagagccccagaaaagaaaggctgctggaagtgtggaaaagaaggacaccag 1260
 atgaaggactgcaccgagcggcagggcaacttcctgggcaagatctggccctcccacaag 1320
 ggcagaccggcaacttcctgcagaacagaccgagcctaccgcccctcccgccgagagc 1380
 ttcagattcgaggaaaccacccctgcccccaagcaggaaagcaaggacagagaggccctg 1440
 acctccctgaagtccttgcttcggcagcgacccccctgtcccagatggtgtccaagggcgag 1500
 gaactgttcaccggcgtggtgcccacatcctggtggaactggacggcgacgtgaacggccac 1560
 aagttcagcgtgtccggcgagggcgagggggatgccacctacggcaagctgaccctgaag 1620
 ttcatctgcaccaccggaaagctgcccgtgcccctggcctaccctggtgacaaccttcacc 1680
 tacggcgtgcagtgttcagcagataccccgaccatatgaagcagcacgacttcttcaag 1740
 agcgccatgcccgagggtacgtgcaggaacggaccatcttcttcaaggacgacggcaac 1800
 tacaagaccagagccgaagtgaagttcgagggcgacaccctggtgaacagaatcgagctg 1860
 aagggcatcgacttcaaagaggacggcaatatcctgggcccacaagctggagtacaactac 1920
 aacagccacaacgtgtacatcatggccgacaagcagaaaaacggcatcaaagtgaacttc 1980
 aagatccggcacaacatcgaggacggcagcgtgcagctggccgaccactaccagcagaac 2040
 acccccatcgggcagcgccccgtgctgctgcccgaatcactacctgagcaccagagc 2100
 gccctgagcaaggacccaacgagaagcgggaccacatggtgctgctggaattcgtgacc 2160
 gccgctggcatcacctgggcatggacgagctgtacaagtga 2202

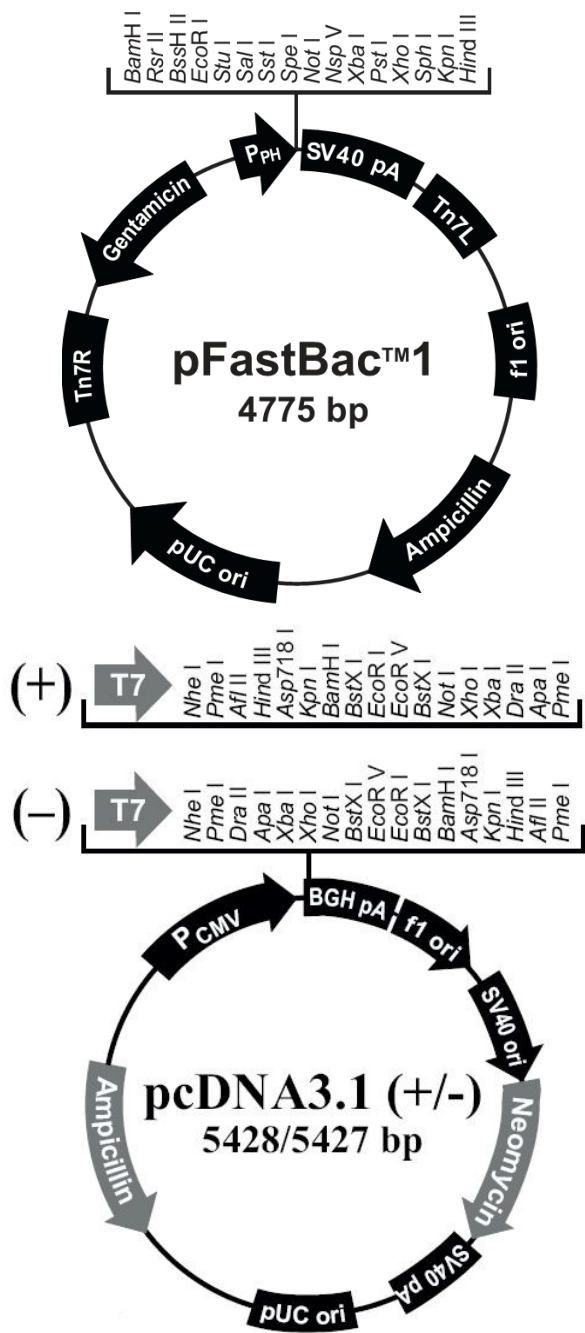
MGARASILRGGKLDKWEKIRLRPGGKKRYMIKHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCKQI 60
 MKQLQPALQTGTEELRSLYNTVATLYCVHEGVEVRDTKEALDRIEEQNKIQQKIQKTQ 120
 QAADGKVSQNYPIVQNLQGQMVHQKLSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFTALSEGATP 180
 QDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRLLHPVHAGPIAPGQMREPRGSDIAGTTS 240
 TLQEQUIAWMTSNPPIPVGDIYKRWIIILGLNKIVRMYSPVSILDIKQGPKEPFRDYVDRFF 300
 KTLRAEQATQEVKNWMTDTLLVQNPDPCKTILKALGPGATLEEMMTACQGVGGPSHKAR 360
 VLAEAMSTNSVNILMQKSNFKGNKRMVKCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGCWKCGKEGHQ 420
 MKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQNRPEPTAPPAESFRFEETTPAPKQESKDREAL 480
 TSLKSLFGSDPLSQMVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYKGLTLK 540
 FICTTGKLPVPWPTLVTFTYGVQCFSRYPDHMKQHDFKFSAMPEGYVQERTIFFKDDGN 600
 YKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNF 660
 KIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVT 720
 AAGITLGMDELYK. 734

IIIB
 ACCESSION P03347

ZM96
 AccNo: AF286224, 96ZM651

DEFINITION pBI-SS(Tom)(TP)101-EGFP [synthetic construct].
 ACCESSION ABG78037

A.2. Verwendete Klonierungsvektoren



A.3. Genetische Eigenschaften verwendeter Bakterien

Verwendete Zellen	Quelle	Genetische Eigenschaften
E. coli DH 5 α	deutsche Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen	F'(Φ80dlacZΔM15), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 ($r_k^- m_k^+$), supI Δ(lacZYA-argF), U169
DH10-Bac™ Zellen	Bac-to-Bac® -KIT (Invitrogen)	F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)7697 galU galK λ- rpsL nupG/bMON14272/pMON7124 (Anleitung Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Invitrogen)

A.4. Spenderliste

Liste der Blutspender für die Experimente mit primären, humanen Blutzellen.

	Alter	Geschlecht
Spender 1	20-30 Jahre	Weiblich
Spender 2	20-30 Jahre	Weiblich
Spender 3	20-30 Jahre	Männlich
Spender 4	20-30 Jahre	Weiblich
Spender 5	20-30 Jahre	Männlich
Spender 6	20-30 Jahre	Männlich
Spender 7	20-30 Jahre	Weiblich

B. Abkürzungen

A Ampere

Abb. Abbildung

AIDS erworbenes Immundefizienz Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome)

Amp Ampicillin

AP Alkalische Phosphatase

APS Ammoniumpersulfat

APZ Antigen präsentierende Zelle

AS Aminosäure

BGH Wachstumshormon des Rindes (bovine growth hormone)

BCIP 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat

bp Basenpaar

bzw. beziehungsweise

CA Kapsid-Protein

ca. circa

CaP Calciumphosphat (CaHPO_4)

CTL zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T-lymphocytes)

Da Dalton

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

E.coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraacetat (Titrplex)

Env Hüllprotein (envelope)

et al. und andere

EtOH Ethanol

FKS Fötales Kälberserum

g Gramm

Gag	Gruppenspezifisches Antigen
gp	Glycoprotein
h	Stunde
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus
HRP	horseradish peroxidase (Merettich-Peroxidase)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
k	kilo (10^3)
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LTR	long terminal repeat
m	Meter oder Milli
M	Molar (Mol pro Liter)
MA	Matrixprotein
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site (Polylinker)
MeOH	Methanol
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (major-histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (messenger)
MW	Molekulargewicht
n	Nano (10^{-9})
NBT	4-Nitro blue tetrazolium chloride
NC	Nucleocapsid

Nef	negative factor
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
p	pico (10^{-9})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
pfu	plaque forming units
pH	Konzentration der H^+ Ionen in einer Lösung
pol	Polymerase
PR	Protease
Rev	regulator of expression of viral proteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RRE	rev responsive element
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SA	Spleiß-Akzeptor (3'-Spleißstelle)
SD	Spleiß-Donor (5'-Spleißstelle)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SIV	Affen-Immundefizienz Virus
Strep	Streptomycin
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAR	tat activating region

Tat	transactivator of transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (tween-tris buffered saline)
U	Enzymeinheit (Unit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
V3	dritte variable Domäne des äußeren HIV-Hüllproteins gp120
vgl.	Vergleich
Vif	Viraler Infektiositätsfaktor
VLP	Virusähnlicher Partikel (virus like particle)
Vol.	Volumen
Vpr	Virales Protein R
Vpu	Virales Protein U
Vpx	Virales Protein X
VSV	vesikulärer Stomatitisvirus
W	Watt
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

C. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Ralf Wagner für das interessante Thema dieser Arbeit, und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. Bernd Salzberger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Josef Köstler möchte ich besonders für die Betreuung dieser Arbeit danken. Danke, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite standest. Ich habe mich durch dich immer gut betreut gefühlt.

Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg

Ein besonderer Dank geht an die beiden MTAs Silvia und Evi, die mir in Bezug auf die Laborarbeit viel gezeigt und geholfen haben.

Dem Rest der Gruppe: Kathi, Kathrin und Philip danke ich für so manche Ideen und Anregungen.

Meinem Freundeskreis (Danke Tom, Chris, Katrin, Stefi, Anke und all die anderen, dass ihr immer für mich da wart, wenn ich über die Arbeit reden musste)

Meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Mirjam möchte ich besonders für ihre Unterstützung danken. Vor allem jedoch danke ich meinem Freund Peter ohne dessen Unterstützung, Liebe und Hilfe ich die Arbeit nie hätte fertig stellen können.